

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Lenka Šebestová

Genetické interakce genu *Prdm9*
Genetic interactions of the *Prdm9* gene

Diplomová práce

Školitel: Ing. Zdeněk Trachtulec, PhD.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2017

.....

Lenka Šebestová

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Zdeňku Trachtulcovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky a velkou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat členům naší laboratoře za odborné konzultace i za dlouhé roky, kdy jsme spolu míchali PCR. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu po celou dobu studia.

Tato práce byla vypracovávána v Oddělení mechanismů vývoje pohlavních buněk na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. a vznikla za finanční podpory grantů GAČR 14-20728S, MŠMTLQ1604, ERDF a MŠMT CZ.1.05/1.1.00/02.0109 (projekt BIOCEV).

Abstrakt

Gen *Prdm9* (*PR domain containing 9, Meisetz, Hybrid sterility 1*) kóduje enzym, který trimethyluje histon 3 na lysinech 4 a 36. Tyto metylační značky určují pozice budoucích dvouřetězcových zlomů DNA, které jsou pak opraveny meiotickou homologní rekombinací. V této práci byly zjišťovány interakce *Prdm9* se dvěma geny důležitými pro spermatogenezi – *Mili* (*Piwi2*) účastnícím se biogeneze piRNA a *Mybl1* kódujícím transkripční faktor regulující expresi genů důležitých pro průběh meiotické profáze I včetně piRNA prekurzorů. Křížením laboratorních myší nesoucích mutovanou alelu *Prdm9* s myši heterozygotními pro mutaci v genu *Mybl1* nebo *Mili* jsme vytvořili samce dvojité heterozygotní a pro *Mybl1* i dvojité homozygotní. U těchto myší jsme stanovili hmotnost těla a parametry fertility (hmotnost varlat, počet spermií v nadvarlatech, procento malformovaných spermií, podíl semenotvorných kanálků obsahujících spermatocyty a procento abnormálních jader pachytenních spermatocytů) a porovnali je s kontrolami. Zkoumali jsme také vliv mutací v *Mybl1* a *Mili* na plodnost F1 mezipoddrhových hybridů. Výsledky odhalily možnou interakci *Prdm9* a *Mybl1* u laboratorních myší. Snížená dávka genu *Mybl1* redukovala fertilitu mezipoddrhových F1 hybridů. Interakci genu *Prdm9* s *Mili* jsme zatím neprokázali ani u laboratorních myší ani u F1 hybridů. Výsledky této práce přispívají k objasnění mechanismů spermatogeneze, a tím i příčin samčí sterility u savců.

Klíčová slova: *Prdm9*, *Mybl1*, *Mili*, myš, spermatogeneze, meióza, fertilita, hybridní sterilita

Abstract

The *Prdm9* gene (*PR domain containing 9, Meisetz, Hybrid sterility 1*) encodes enzyme that trimethylates histone 3 on lysines 4 and 36. These methylation marks determine the positions of DNA double-strand breaks that are repaired by meiotic homologous recombination. In this study, we assayed genetic interactions of *Prdm9* with two genes important for spermatogenesis – *Mili* (*Piwi2*) involved in piRNA biogenesis and *Mybl1* encoding transcription factor that regulates many genes important for prophase I, including piRNA precursors. We crossed laboratory mice carrying mutation in *Prdm9* with heterozygotes for mutation in *Mybl1* or *Mili*, and created compound heterozygotes and, in case of *Mybl1*, also double homozygotes. We assessed body weight and male fertility parameters (weight of testes, sperm count, malformed sperm, percentage of tubules containing spermatocytes and of abnormal nuclei of pachytene spermatocytes) of these mice and compared them to controls. We also investigated the effect of *Mybl1* and *Mili* mutations on fecundity of F1 intersubspecific hybrids. Our results revealed possible interactions of *Prdm9* and *Mybl1* in the laboratory mouse. Decreased gene dosage of *Mybl1* reduced fertility of intersubspecific F1 hybrids. Interaction between *Prdm9* and *Mili* in both laboratory mouse and F1 hybrids remain to be proven. This study contributes to the characterization of the mechanisms of spermatogenesis and thereby of the causes of male sterility in mammals.

Keywords: *Prdm9*, *Mybl1*, *Mili*, mouse, spermatogenesis, meiosis, fertility, hybrid sterility

Obsah

1	Úvod	13
2	Přehled literatury	14
2.1	Spermatogeneze a meióza	14
2.2	PRDM9	22
2.3	piRNA ve spermatogenezi	29
2.4	Regulace exprese genů včetně piRNA v pachytene genem <i>Mybl1</i>	39
2.5	Epistáze	43
3	Cíle práce	45
4	Materiál a metody	46
4.1	Materiál	46
4.2	Metody	49
4.2.1	Určování genotypu	49
4.2.2	Určování fenotypu	52
4.3	Použité chemikálie a přístroje	59
5	Výsledky	63
5.1	Interakce <i>Prdm9</i> a <i>Mybl1</i>	63
5.1.1	Fenotyp složených heterozygotů pro mutace <i>Prdm9^{tm1Ymat}</i> a <i>Mybl1^{repro9}</i>	63
5.1.2	Mutace <i>Mybl1^{repro9}</i> ovlivňuje fertilitu mezipoddrhových hybridů	69
5.2	Interakce <i>Prdm9</i> a <i>Mili</i> (<i>Piwil2</i>)	72
5.2.1	Fenotyp složených heterozygotů pro mutace <i>Prdm9^{tm1Ymat}</i> a <i>Mili^{DAH}</i>	72
5.2.2	Mutace <i>Mili^{DAH}</i> neovlivňuje fertilitu u mezipoddrhových F1 hybridů	75
6	Diskuze	76
7	Souhrn	80
8	Seznam použité literatury	81

Seznam použitých zkratek

3D-SIM	3D structured illumination microscopy
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
bp	base pair = pár bazí
BRCA1	breast cancer 1
C57BL/6J	myši inbrední kmen; B6
C-konec	karboxylový konec proteinu
CO	crossing-over
DMC1	DMC1 dosage supressor of mck1 homolog
DNMT3L	DNA methyltransferase 3-like; DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like
DSB	dvouřetězcový zlom DNA
DSBs	double-strand breaks = dvouřetězcové zlomy DNA
EXO1	exonuclease 1; exonukleáza I
H2A	histon H2A
H2AFY	H2A histonová rodina, člen Y; MACROH2A1.2
H2AZ	H2A histonová rodina, člen Z; H2AFZ
H3	histon 3
H3K36me3	trimethylace histonu 3 na lysinu 36
H3K4me3	trimethylace histonu 3 na lysinu 4
H3K9me2	dimethylace histonu 3 na lysinu 9
HORMA domain	doména HORMA (= Hop1, Rev7 and MAD2 homology domain)
HORMAD1	HORMA domain containing 1
HORMAD2	HORMA domain containing 2
HST1	hybrid sterility 1
KRAB	Krüppel-associated box
LINE	long interspersed nuclear elements
LTR	long terminal repeat
MEI1	meiotic double-stranded break formation protein 1
MEI4	meiotic double-stranded break formation protein 4
Meisetz	meiosis-induced factor containing a PR/SET domain and zinc-finger motif
MILI	PIWIL2; piwi like RNA-mediated gene silencing 2

miRNA	microRNA
MIWI	PIWIL1; piwi like RNA-mediated gene silencing 1
MIWI2	PIWIL4; piwi like RNA-mediated gene silencing 4
MLH3	mutL homolog 3
MSCI	meiotic sex chromosome inactivation; meiotická inaktivace pohlavních chromozomů
MSUC	meiotic silencing of unsynapsed chromatin; meiotické umlčování nesynapsovaného chromatinu
MYBL1	myeloblastosis oncogene-like 1
NCO	non-crossover
N-konec	konec proteinu s aminoskupinou
PGCs	primordial germ cells; primordiální zárodečné buňky
piRNA	PIWI (P-element-induced wimpy testis)-interacting RNA
PIWIL1	piwi like RNA-mediated gene silencing 1; MIWI
PIWIL2	piwi like RNA-mediated gene silencing 2; MILI
PIWIL4	piwi like RNA-mediated gene silencing 4; MIWI2
PMSC	post-meiotic sex chromatin
PRDM9	PR domain containing 9
PWD	myší inbrední kmen; PWD/Ph
RAD21	radiation sensitive 21
RAD21L	RAD21-like protein
RAD51	RAD51 homolog
REC114	REC114 meiotic recombination protein
REC8	REC8 meiotic recombination protein
RPA	replication protein A
SC	synaptonemální komplex
SINE	short interspersed nuclear elements
siRNA	short interfering RNA
SMC1 α	structural maintenance of chromosomes 1A; SMC1a
SMC1 β	structural maintenance of chromosomes 1B; SMC1b
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3
SPO11	SPO11 meiotic protein covalently bound to DSB
SSXRD	SSX repression domain
STAG1	stromal antigen protein 1; SA1

STAG2	stromal antigen protein 2; SA2
STAG3	stromal antigen protein 3
SUN1	Sad1 and UNC84 domain containing 1
SYCE1	synaptonemal complex central element protein 1
SYCE2	synaptonemal complex central element protein 2
SYCE3	synaptonemal complex central element protein 3
SYCP1	SCP1; synaptonemal complex protein 1
SYCP2	SCP2; synaptonemal complex protein 2
SYCP3	SCP3; synaptonemal complex protein 3
TE	transponovatelné elementy; transpozony
TEX12	testis expressed gene 12
XY tělísko	sex body; pohlavní tělísko
γ H2AFX	fosforylovaná forma (Ser 139) histonové varianty H2AFX; γ H2AX

1 Úvod

Neplodnost u člověka je problém, který celosvětově postihuje až 15% párů. Přibližně na polovině případů se podílí sterilita u mužů, ve 20-30 % všech případů je problém výhradně u mužů (Agarwal, Mulgund, Hamada, & Chyatte, 2012).

Sterilita u samců může být u myši i u člověka způsobena mnoha faktory; mezi nimi i mutací v genech důležitých pro meiózu a spermatogenezi – k těmto genům patří mimo jiné i *Prdm9*, *Mili* (*Piwil2*), *Mybl1*.

Gen *Prdm9* kóduje histon-methyltransferázu, která určuje lokalizaci meiotických hotspotů – míst, kde s vysokou pravděpodobností dochází k meiotické rekombinaci (Mihola et al., 2009, Baudat et al., 2010). Zároveň byl identifikován jako první gen hybridní sterility (Mihola et al. 2009) u obratlovců a mohl by mít funkci i ve speciaci dalších druhů (Oliver et al., 2009).

MILI (PIWIL2) je protein účastnící se biogeneze třídy malých regulačních RNA – piRNA (*PIWI-interacting RNAs*). PiRNA zajišťují represi transpozonů v samčích zárodečných buňkách a v pachytene se podílejí na regulaci spermiogeneze (Aravin et al., 2008, Gou et al., 2014).

Funkcí transkripčního faktoru MYBL1 je regulace genů kódujících mnohé meiotické procesy – opravu dvouřetězcových zlomů, synapsi, průchod buněčným cyklem v profázi I a reguluje i řadu genů fungujících postmeioticky (Bolcun-Filas et al., 2011). Zároveň kontroluje i expresi prekurzorových genů piRNA i některé faktory účastnící se jejich biogeneze (Li et al., 2013).

Všechny tyto geny – *Prdm9*, *Mili* (*Piwil2*) a *Mybl1* jsou exprimované v meiotické profázi I a jejich deficiencie způsobuje u myších samců defekty ve spermatogenezi a zástavu meiózy (Hayashi et al., 2005; Toscani et al., 1997; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004).

Tato práce se pokouší odhalit, zda *Prdm9* ve spermatogenezi interaguje s *Mybl1* nebo s *Mili* (*Piwil2*).

2 Přehled literatury

2.1 Spermatogeneze a meióza

Myš domácí patří mezi pohlavně se rozmnožující organismy. Splynutím samčí a samičí haploidní pohlavní buňky - spermie a oocyty - vzniká diploidní zygota, ze které se vyvíjí nový jedinec.

Spermatogeneze

Spermie vznikají procesem spermatogeneze. Během spermatogeneze jsou z prekurzorů – spermatogonií produkovány samčí pohlavní buňky – spermie.

Z primordiálních zárodečných buněk (PGCs) vznikají spermatogonie typu A₁. Tyto buňky jsou kmenovými buňkami, takže jejich mitotickým dělením vznikají buď nové spermatogonie A₁ (sebeobnova), nebo další typ už částečně diferencovaných spermatogonií A₂. Ty se mohou opět dělit mitózou za vzniku A₂ nebo diferencovat na typ A₃, poté dále na typ A₄. Z typu A₄ vznikají intermediální spermatogonie, které se mitoticky rozdělí na spermatogonie typu B (Obr. 2.1).

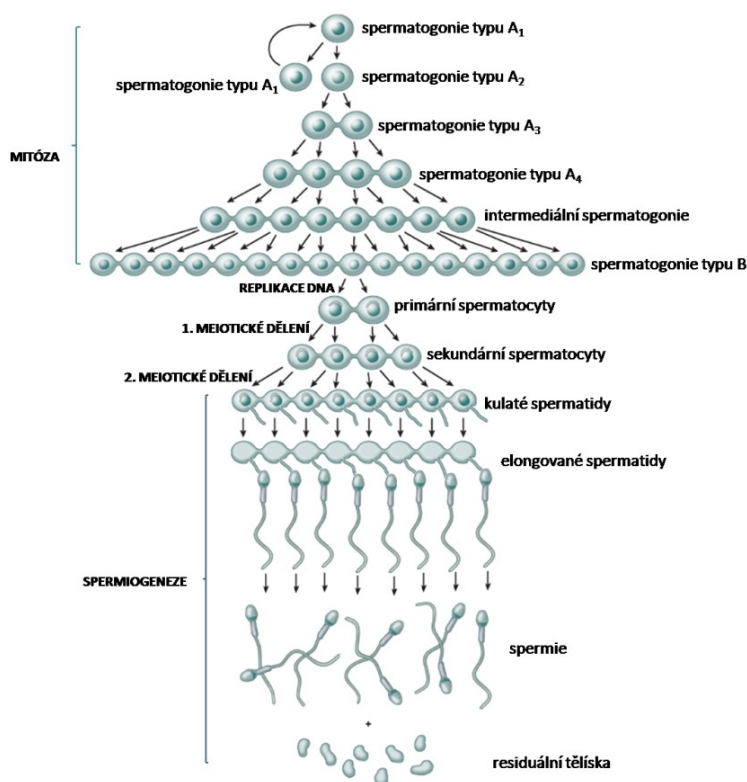
Spermatogonie typu B jsou prekurzory primárních spermatocytů, které vstupují do meiózy. Z primárních spermatocytů (s duplikovaným množstvím diploidních chromozomů) meiózou I vznikají diploidní sekundární spermatocyty. Druhým meiotickým dělením z nich dále vznikají haploidní spermatidy. Ze spermatid se potom diferenciačním procesem spermiogeneze tvoří spermie (Gilbert & Barresi, 2016; Hess & de Franca, 2008).

Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích ve varlatech. Buňky v různých fázích vývoje v nich tvoří koncentrické vrstvy tak, že spermatogonie se nacházejí u bazální membrány a spermie se uvolňují do lumen kanálků. Kromě různých typů spermatogenních buněk se v kanálku nacházejí také Sertoliho buňky, které jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze – zajišťují speciální prostředí pro zárodečné buňky a mají podpůrnou i regulační funkci, včetně fagocytózy a sekrece různých proteinů a růstových faktorů (Griswold, 1998; Hess & de Franca, 2008) .

Meióza

Meiotické dělení je podstatnou součástí spermatogeneze, protože zajišťuje redukci počtu chromozomů na polovinu. Z diploidní buňky se dvěma sadami chromozomů může

tak vzniknout pohlavní buňka, která má již jen jednu chromozomální sadu a je tudíž haploidní. Diploidní stav buňky je poté obnoven fúzí pohlavních buněk při vzniku zygoty.



Obr. 2. 1. Schéma spermatogeneze

Z PGCs se vyvíjejí spermatogonie. Spermatogonie typu A₁ je kmenovou buňkou, může se tedy dělit bez diferenciace nebo se postupně diferencovat do dalších typů spermatogonií – A₂, A₃, A₄, intermediální a typu B.

Spermatogonie se dělí mitoticky. Ze spermatogonií typu B mitoticky a po replikaci DNA vznikají primární spermatocyty. Z primárních spermatocytů vznikají meiózou I sekundární spermatocyty, z nich následně meiózou II haploidní kulaté spermatidy, které dále diferencují do spermií (spermiogeneze).

Obrázek převzat z <http://digital-world-medical-school.net/>, upraveno podle Gilbert & Barresi, 2016

Meióza se skládá ze dvou po sobě následujících dělení: meiózy I – redukčního dělení a meiózy II – ekvačního dělení. Meióza I i meióza II se dále dělí na další stádia: profáze I, metafáze I, anafáze I, telofáze I, resp. profáze II, metafáze II, anafáze II, telofáze II.

Do meiózy I vstupuje diploidní primární spermatocyt s replikovanou DNA; tato buňka obsahuje dva homologické chromozomy (jeden parentální, druhý maternální), z nichž každý sestává ze dvou chromatid (Petronczki et al., 2003).

Během profáze I dochází k programované indukci tvorby dvouřetězcových zlomů a k následné reciproké výměně částí chromatid homologických chromozomů. Mohou tak vzniknout nové kombinace alel, které přispívají ke zvýšení genetické variability potomstva. Dalším faktorem, ještě zvyšujícím genetickou různorodost, je náhodný rozchod homologických chromozomů (do dvou buněk sekundárních spermatocytů), který je výsledkem meiózy I (Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

Meióza II je podobná mitóze (Wilkins & Holliday, 2009). Dochází při ní k rozdělení sesterských chromatid pocházejících z jednoho sekundárního spermatocyty do dvou haploidních spermatid. Ze spermatid se procesem spermiogeneze diferencují zralé spermie. Z jednoho původního diploidního primárního spermatocyty tedy nakonec vznikají ideálně čtyři haploidní spermie.

Pro správnou segregaci chromozomů během meiózy jsou podstatné některé komplexy, které se podstatně liší od komplexů somatických buněk. Příkladem jsou meiotické koheziny. Jedná se o proteinové prstencové struktury, které zajišťují asociaci sesterských chromatid tak, aby se od sebe rozdělily až v rámci druhého meiotického dělení (Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

Meiotické koheziny jsou složeny ze čtyř podjednotek: SMC3, jeden ze SMC1 α a SMC1 β , α -kleisinového proteinu RAD21, RAD21L nebo REC8 a proteinu STAG1, STAG2 nebo STAG3 (shrnutí ve Ward et al., 2016). Kohezinové komplexy asociují i se synaptonemálním komplexem (viz dále) a je možné, že hrají roli i při párování homologů (Ishiguro et al., 2011).

Profáze I

Profázi meiózy I lze rozlišit do pěti stádií – leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze (Obr. 2.2).

V leptotene jsou chromozomy ještě relativně dekonzenzované, ale podél sesterských chromatid začínají vznikat malé úseky axiálního elementu. Axiální element je struktura, složená z proteinů úzce asociujících s chromatinem, tvořící „lešení“ podél chromozomů. Během zygotene se homologní chromozomy začínají párovat – axiální elementy se prodlužují a mezi nimi se začíná vystavovat další struktura – centrální element budoucího synaptonemálního komplexu (Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

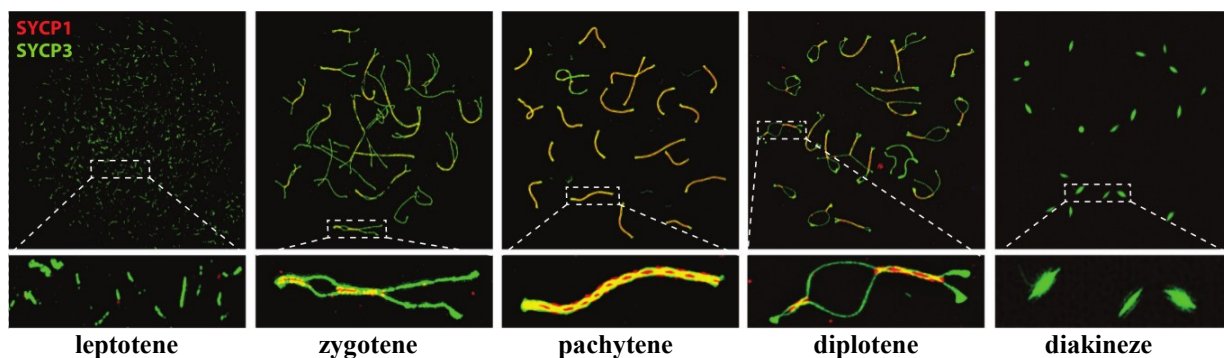
Synaptonemální komplex (SC) je nukleoproteinová struktura, která tvoří podpůrnou strukturu (připomínající žebřík) udržující asociaci homologických chromozomů a je důležitá pro rekombinaci. Skládá se ze dvou laterálních elementů (= původní axiální elementy) a centrálního elementu vystavěného mezi nimi. Laterální elementy spojují s centrálním elementem transverzální filamenta.

Hlavními komponenty SC jsou proteiny SYCP1 (hlavně součást transverzálních filament), SYCP2 a SYCP3 (součást laterálních elementů). K hlavním složkám centrálního elementu patří SYCE1, SYCE2, SYCE3 a TEX12 (Lu et al., 2014).

Párování homologických chromozomů během profáze I je usnadněno mechanismem, který je zprostředkován interakcí telomer. Telomery jsou během přechodu mezi leptotene a zygotene uchyceny k jadernému obalu, kde se přechodně sbíhají a vytvářejí „bouquet“ (kytici). Tato interakce pravděpodobně funguje jako mechanismus testování homologie a hraje zde roli protein SUN1, který je nezbytný k uchycení telomer k jadernému obalu a má i další funkce v meiotické rekombinaci (Bass et al., 2000; Bolcun-Filas & Schimenti, 2012, Baudat et al., 2013; Boateng et al., 2013)

Pachytenní chromozomy jsou charakteristické kompletní synapsí po celé jejich délce. Synaptonemální komplex je plně formovaný po celé délce chromozomů a chromozomy jsou vysoce kondenzované.

Obr. 2. 2. Formování SC a průběh synapse během profáze I



Chromozomy samčích myších spermatocytů v různých fázích profáze I s imunofluorescenčně značenými součástmi SC (SYCP3 – součást axiálních elementů, značené zeleně, SYCP1 – součást transverzálních filament, značené červeně), zachycené pomocí 3D-SIM (= 3D structured illumination microscopy).

V leptotene se začínají formovat podél chromozomů axiální elementy, v zygotene jsou již vystaveny podél celé osy homologických chromozomů a transverzální filamenta je začínají spojovat dohromady do SC. V pachytene jsou v synapsi již všechny autozomy a pseudoautozomální oblast pohlavních chromozomů, během diplotene se SC začíná rozkládat a homology zůstávají spojeny pouze v oblastech, kde proběhly CO; v diakinezi zůstávají axiální elementy viditelné pouze v okolí centromer (Gray & Cohen, 2016).

Zároveň se synapsí chromozomů probíhá během profáze I i rekombinace mezi homologickými chromozomy, která je indukována tvorbou dvouřetězcových zlomů DNA (DSBs). Tyto zlomy mohou být poté opraveny jako *crossing-over* (CO) nebo *non-crossover* (NCO). Jako CO je označována reciproká výměna částí chromozomů mezi homology, dojde k výměně alel na relativně dlouhých úsecích chromozomů. NCO neboli genová konverze je pouze jednosměrný přenos genetické informace na krátkých úsecích chromozomů (Baudat et al., 2013).

Dalším důsledkem CO jsou chiasmata – to jsou místa, kde homologické chromozomy zůstanou fyzicky spojené po proběhlém CO. Tvorba chiasmat (minimálně jeden proběhlý CO na pár homologických chromozomů) je nezbytná pro správné rozdělení homologů během metafáze I (shrnutí v Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

Diplozene profáze I je charakteristická počátkem rozkládání SC. Homologické chromozomy zůstávají ve spojení pouze v oblasti chiasmat; v diakinezi je SC již téměř rozložený (Gray & Cohen, 2016).

Meiotická rekombinace

Meiotická rekombinace je iniciována vznikem dvouřetězcových zlomů DNA (DSBs) v leptotene (Baudat et al., 2013). Tvorba DSBs je katalyzována aktivitou SPO11, konzervovaného meiotického proteinu s topoizomerázovou aktivitou (Keeney et al., 1997). K dalším proteinům účastnícím se tvorby DSBs patří proteiny MEI4, REC114 a MEI1. Po indukci DSBs je SPO11 ve komplexu s oligonukleotidy uvolněna z DNA (Lamarche et al., 2010). EXO1 (exonukleáza I) následně dále exonukleolyticky (ve směru 5' → 3') degraduje tentýž řetězec, obojí tak vede k vytvoření 3' jednořetězcových přesahů na obou stranách DSB. Na tyto přesahy se váže zejména RPA (replication protein A) a s konci řetězců asociují rekombinázy RAD51 a DMC1, které zajišťují invazi řetězců (Barlow et al., 1997). Současně s přechodem z leptotene do zygotene dochází i k budování SC; interakce zprostředkované pomocí proteinů souvisejících s RAD51 a DMC1 napomáhají hledání homologů a stabilizují interakci mezi nimi (shrnutí v Baudat et al., 2013).

Po navázání RAD51 a DMC1 se jeden 3' konec volného jednořetězce vmezeří mezi vlákna druhé dvoušroubovice, původní řetězec je vytlačen (formuje se D-smyčka = *D-loop*) a dojde k prodloužení vmezeřeného 3' konce. Druhý konec může pak může interagovat buď s D-smyčkou nebo s elongovaným vmezeřujícím se řetězcem z původní chromatidy a vznikná buď CO nebo NCO (Obr. 2.3). CO či NCO jsou vytvořeny na konci pachytene (shrnutí v Baudat et al. 2013); chiasmata, jako místa překřížení chromozomů po proběhlém CO jsou viditelná v diplozene (Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

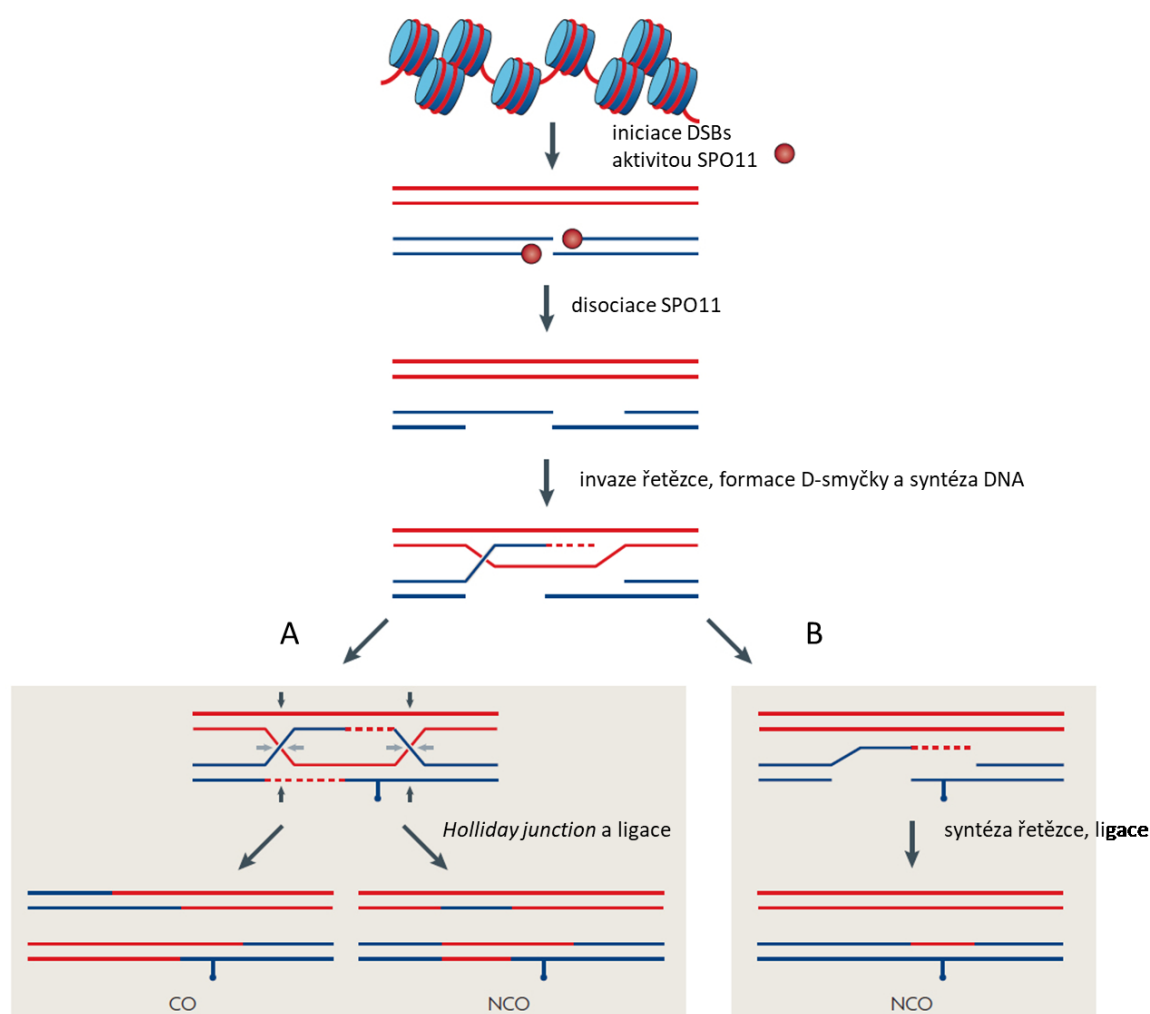
Ke správnému průběhu oprav DSBs mimo jiné pravděpodobně přispívají proteiny SC (SYCP3), součásti meiotických kohezinových komplexů i meiotické proteiny obsahující doménu HORMA - HORMAD1 a HORMAD2 (Wojtasz et al., 2009).

Savčí HORMA-domain proteiny – HORMAD1 a HORMAD2 jsou specificky exprimované během meiotické profáze I. Během leptotene a zygotene asociuje HORMAD2 zejména s formujícími axiálními elementy (společně s SYCP3) a s

chromozomy, které nejsou v synapsi; v pachytene a diplotene je přítomen hlavně na nesynapsovaných oblastech pohlavních chromozomů. Funkcí HORMA-domain proteinů je zejména směřování opravy DSBs směrem k homologickým chromozomům, jsou nezbytné při párování homologů (hledání homologických chromozomů) a formaci CO (Wojtazs et. al. 2009).

Meiotické rekombinace a její regulace se samozřejmě účastní i mnoho jiných proteinů, jejich popis je však nad rámec této práce.

Obr. 2.3. Zjednodušený model meiotické rekombinace u myši.



Dvouřetězcové zlomy DNA (DSBs) jsou indukovány aktivitou SPO11. Ta je poté vyštěpena a v komplexu s oligonukleotidy disociuje z chromozomů. Řetězce jsou poté degradovány za vytvoření jednořetězcových přesahů. Za pomoci rekombináz RAD51 a DMC1 jsou tyto přesahy vmezeřeny do DNA řetězce druhého homologu a vytvoří se D-smyčka. Poté může vzniknout buď CO (*crossing over*) nebo NCO (*non-crossover*).

A. Vmezeřující se řetězec může být zachycen na řetězci druhého homologu a po syntéze DNA vzniká struktura

B. Holliday junction, která může být rozštěpena za vzniku CO či NCO

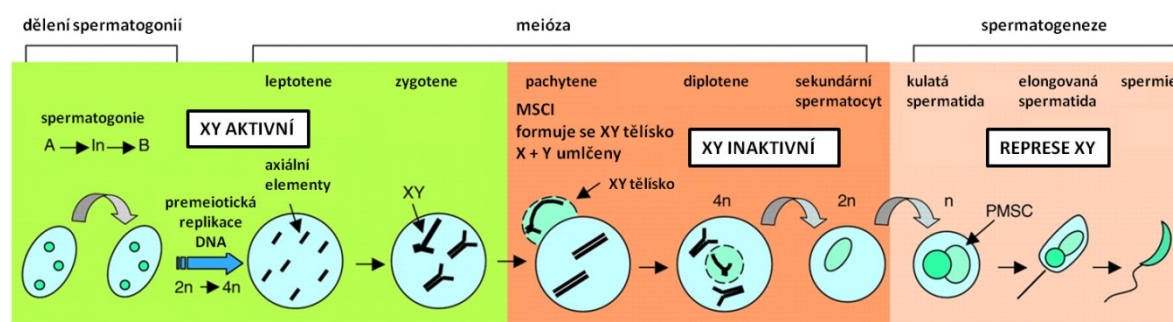
Vmezeřující se řetězec může být vytlačen a dislokován a zpětně asociuje s původní stranou DSB za vzniku NCO

Podle Paigen & Petkov, 2010 a Grey & Cohen, 2016, upraveno

Pohlavní chromozomy během meiózy u myši

Myš má 20 párů chromozomů, 19 autosomů a pohlavní chromozomy X a Y. Všechny chromozomy jsou telocentrické (Silver, 1995). Samčí pohlaví je heterogametické, u samic je tedy přítomno 19 párů autosomů a gonozomy X a Y (Silver, 1995). Vzhledem k tomu, že gonozomy X a Y nejsou homologické po celé délce, mohou během meiózy párovat pouze v oblasti pseudoautosomálního regionu (délka pseudoautosomálního regionu u myši kmene 129 je 700-720 kb) (Perry et al., 2001). Během meiózy dochází tedy pouze k částečné synapsi a také k meiotickému transkripčnímu umlčení pohlavních chromozomů (MSCI = *meiotic sex chromosome inactivation* – „meiotická inaktivace pohlavních chromozomů“ (shrnutí v Turner, 2007).

Obr. 2.4. Transkripční aktivita genů na chromozomech X a Y během spermatogeneze



zelená – vysoká exprese, oranžová – nízká exprese

Během mitotického dělení spermatogonií (typy A, In i B) jsou geny na X a Y stále aktivní. Transkripčně aktivní zůstávají i při vstupu do meiózy během leptotene a zygotene. Na přechodu mezi zygotene a pachytene dochází k asociaci BRCA1 a ATR s nesynapsovanými částmi X a Y chromozomů a dochází k fosforylaci H2AFX a transkripčnímu umlčení pohlavních chromozomů (MSCI). X a Y zůstávají umlčené do dokončení meiotického dělení. Pohlavní chromozomy jsou viditelné v uzavřených heterochromatinových doménách – PMSC (post-meiotic sex chromatin – světle tyrkysová). Během spermiogeneze dochází k výměně histonů za protaminy a k dalšímu kompaktnějšímu sbalení chromatinu (Turner et al. 2007).

Při vstupu do meiózy jsou geny na pohlavních chromozomech transkripčně aktivní (Obr. 2.4). Při přechodu ze zygotene do pachytene, kdy jsou již všechny autosomy v synapsi, chromozomy X a Y jsou transkripčně umlčeny a umístěny do periferního jaderného kompartmentu „XY tělíska“ (= „pohlavní tělíska“; *XY body*; *sex body*). Chromozomy pak zůstávají téměř celé umlčeny po zbytek spermatogeneze. Pro MSCI jsou charakteristické různé posttranslační modifikace histonů (ubikvitinace H2A, dimethylace H3 na K9 (H3K9me2), deacetylace H3 a H4) i inkorporace specifických histonových variant (H2AFY, H2AZ) (shrnutí v Turner, 2007).

XY tělísko je charakteristické výskytem fosforylované formy histonové varianty γ H2AFX (γ H2AX; fosforylace na serinu 139). H2AFX je fosforylována ATR kinázou (proteinem regulujícím opravy DNA) jednak při indukci DSBs v leptotene, jednak při vstupu do pachytene na chromatinu gonozomů. H2AX je defosforylována při přechodu z diplotene do meta fáze I (shrnutí v Turner, 2007).

MSCI se zdá být součástí mnohem obecnějšího jevu nazvaného MSUC (= *meiotic silencing of unsynapsed chromatin* = „meiotické umlčování nesynapsovaného chromatinu“), kdy je umlčením homologu, který není schopen párovat se svým protějškem, zamezen vznik aneuploidních buněk (Homolka et al., 2007).

2.2 PRDM9

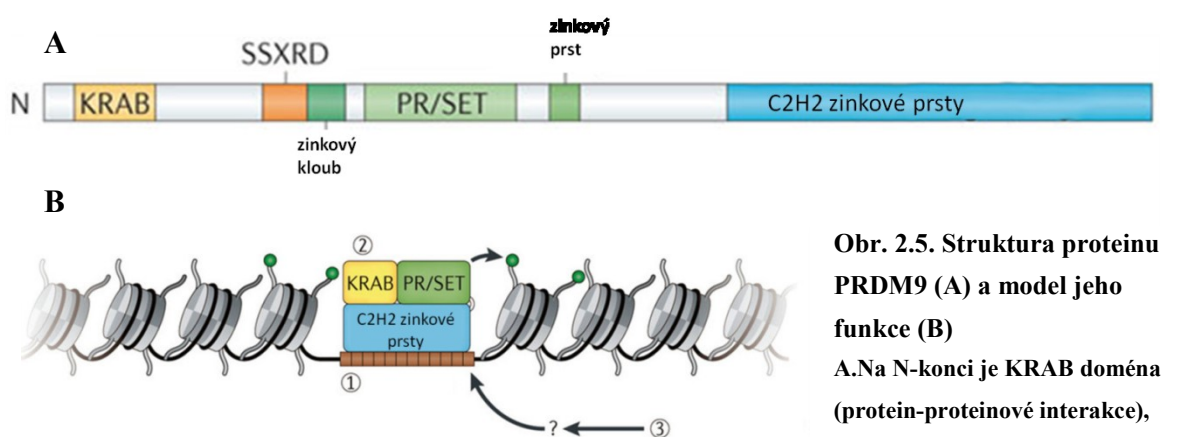
Hotspoty a PRDM9

K meiotické rekombinaci dochází s vyšší frekvencí v místech zvaných „hotspoty“ (= *hotspots*). Jsou to 1-2 kb dlouhé intervaly, které jsou nenáhodně rozmístěny podél chromozomů a jsou odděleny oblastmi s nízkým výskytem rekombinace (Paigen & Petkov, 2010). V celém myším genomu se nachází řádově 15 000 – 20 000 hot spotů (shrnutí v Baudat et al., 2013). Lokalizace hotspotů je u myši i u člověka určována proteinem PRDM9 (*PR-domain containing 9*, HST1 – *hybrid sterility 1*, MEISETZ) (Baudat et al., 2010; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010).

Protein PRDM9

PRDM9 je histon-methyltransferáza, která trimethyluje histon 3 na lysinu 4 a na lysinu 36 (H3K4me3, H3K36me3) (Hayashi et al., 2005; Míhola et al., 2009; Powers et al., 2016). Na základě této epigenetické značky pak na toto místo patrně nasedají další proteiny indukující vznik DSBs (Obr. 2.5. B).

Protein PRDM9 je složen z několika domén (Obr. 2.5. A). PR/SET doména má methyltransferázovou aktivitu, KRAB (= *Krüppel-associated box*) doména na N-konci zprostředkovává protein-proteinové interakce a dlouhá repetice C2H2 zinkových prstů (= *C2H2 zinc finger array*) na C-konci má DNA vazebnou aktivitu. PRDM9 se pomocí domény zinkových prstů specificky naváže na DNA, kde poté PR/SET doména methyluje histony přilehlých nukleozomů.



Obr. 2.5. Struktura proteinu PRDM9 (A) a model jeho funkce (B)
A. Na N-konci je KRAB doména (protein-proteinové interakce), následuje SSXRD (*SSX repression domain*), poté „zinkový kloub“ (*zinc knuckle*) a jeden zinkový prst, mezi nimi vymežena PR/SET doména (methyltransferázová aktivita) a na C-konci je tandem zinkových prstů (DNA vazebná doména)

B. 1. rozpoznání sekvenční na DNA; 2. methylace H3K4me3 a H3K36me3; 3. zřejmě nasedání proteinů souvisejících s DSBs a jejich opravou

Hayashi 2005, obrázek Baudat et. al. 2013, upraveno podle Powers et. al. 2016

Histon-methyltransferáza PRDM9 je specificky exprimovaná pouze v meiotických buňkách – samičích fetálních gonádách a samčích postnatálních varlatech. A její přítomnost je nezbytná pro správný průběh profáze I a dokončení spermatogeneze (Hayashi et al., 2005; Sun et al., 2015). Exprese *Prdm9* byla detekována v primárních spermatocytech v časně meiotické profázi I – v preleptotene, leptotene, zygotene (Sun et al., 2015). V pozdním zygotene se signál již ztrácí. V pachytene se ztrácí z hotspotů i H3K4 methylační značky (Sun et al., 2015).

Byl vytvořen myší kmen nesoucí deletovanou alelu genu *Prdm9* (alela *Prdm9^{tm1Ymat}* – v genu *Prdm9* byly přerušeny exony 2-7; došlo k delecí iniciačního kodonu a N-konce proteinu) na smíšeném 129P2/OlaHsd x C57BL/6 genetickém pozadí (Hayashi et al., 2005). Myši homozygotní pro tuto mutaci byly životaschopné, beze změn ve váze těla. Ovšem váha varlat byla oproti kontrolám snížena o 75% (u osmitýdenních myší). Samci i samičky byli sterilní. U samců byla zjištěna meiotická zástava v pachytene, ve varlatech nebyly přítomny kulaté a elongované spermatidy ani spermie. Imunofluorescenční barvení jader dále odhalilo chyby při párování homologů, defektní formaci XY tělíska i chyby při opravě DSBs (Hayashi et al., 2005; Sun et al., 2015). Myši heterozygotní pro tuto alelu produkují potomky (Hayashi et al., 2005) a jejich váha testes a počet spermií byla srovnatelná s kontrolami (C. L. Baker et al., 2015; Flachs et al., 2012). Oproti tomu mají redukováné množství proteinu PRDM9 (Sun et al., 2015, Baker et al., 2015) a snížené množství DSB hotspotů hladinu jejich H3K4me3 (Baker et al., 2015). Nepřímé imunofluorescenční barvení jader odhalilo zvýšené množství abnormálních pachytenních spermatocytů s defektní tvorbou XY tělíska; tyto myši měly asi 5% abnormálních jader, jejich B6 sourozenské kontroly signifikantně méně (cca 1%). Imunofluorescenční barvení protilátkami proti RAD51 a DMC1 dále odhalilo, že množství DSBs není u heterozygotů B6-*Prdm9^{tm1Ymat}/B6* redukováno (Baker et al., 2015). Samci ale produkovali méně potomků (C. L. Baker et al., 2015). Funkce PRDM9 je tedy závislá na dávce genu (parciální haploinsuficience) a dostupnosti funkčního proteinu (Baker et al., 2015).

PRDM9 je lokalizovaný v jádrech v podobném časovém okně, kdy meiotické koheziny asociují s chromozomy. V myších spermatocytech deficientních pro *Prdm9* nebyla narušena lokalizace kohezínů, PRDM9 tedy pravděpodobně nemá vliv na jejich nasedání. Zároveň nedošlo ani ke změnám v množství lokalizace RAD51, takže množství DSBs oproti kontrolám je srovnatelné, dochází ale pravděpodobně k defektní opravě DSBs (Sun et al., 2015).

Existují ještě další mutace genu *Prdm9*: ENU mutagenézí byla generována alela *Prdm9^{M1045Lja}* (změna nukleotidů na pozici 739 z A na T způsobilo změnu kodonu leucinu 247 na stop kodon; C57BL/6J (dále B6) genetické pozadí; Weiss et al., 2012) U této mutace byl detekován zkrácený protein PRDM9 (na rozdíl od *Prdm9^{tm1Ymat}*, kde detekován nebyl). Po křížení s kmenem DBA měli někteří samci heterozygotní pro alelu *Prdm9^{M1045Lja}* ve varlatech přítomné kulaté spermatidy, ale už ne elongované spermatidy, ani spermie. Jedna funkční alela *Prdm9* tedy nezajistila produkci funkčních spermií (haploinsuficience), i když nešlo vyloučit, že měly vliv i jiné indukované mutace nebo genetické pozadí. Homozygoti měli redukovanou váhu testes a v semenotvorných kanálcích byly přítomny pouze premeiotické buňky (Weiss et al., 2012).

Prdm9 není nezbytný pro formování DSBs, protože v jeho nepřítomnosti formovány jsou, dochází ale k jejich změně lokalizaci. Inicie rekombinace je stále soustředěna do hotspotů, ovšem je posunuta jejich lokalizace (Brick et al., 2012). Tyto hotspoty jsou stále asociované s H3K4me3 značkami, ale s takovými, které nejsou vytvořeny aktivitou PRDM9, ale jiných enzymů. Hotspoty jsou posunuty směrem do funkčních genetických elementů, promotorů, enhancerů. Ke správné opravě DSBs ale nedochází, což dále brání normálnímu průchodu meiózou (Brick et al., 2012). Je tedy možné, že jednou z funkcí PRDM9 je směřování proteinů iniciujících tvorbu DSBs (nebo opravných proteinů) mimo promotory, aby nedošlo k porušení exprese genů.

DNA vazebná doména C2H2 je v genu *Prdm9* kódována minisatelitem a jedná se o rychle se vyvíjející sekvenci (Mihola et al., 2009; Oliver et al., 2009). Různé myší kmeny mají různé alely *Prdm9* – různý počet kopií C2H2 zinkových prstů v tandemu za sebou (např. kmen B6 má 13 opakování, kmen C3H 14 (Mihola et al., 2009, Parvanov et al., 2010). Tyto odlišné alely mají různou DNA vazebnou specifitu a v rámci evoluce se tedy dynamicky mění rozpoznávaná sekvence (Smagulova et al., 2016). V přítomnosti dvou různých alel *Prdm9* zůstává počet rekombinačních hotspotů srovnatelný se situací, kdy jsou obě alely shodné (počet se nezdvojuje) (Brick et al. 2012).

Z tisíců hotspotů determinovaných pomocí PRDM9 je v meióze „použito“ pouze několik stovek, z nichž je 20-25 nakonec zpracováno jako CO. Vzhledem k tomu, že H3K4me3 značek je více než DSBs, nejsou pravděpodobně dostatečné pro specifikaci hotspotů (Brick et al., 2012).

Mechanismus, kterým je PRDM9 oddisociován a jeho methylační značky z chromatinu odstraněny či přepsány není zatím zcela objasněn. Je možné, že to závisí na

stabilitě proteinu, regulaci průchodu meiotickým buněčným cyklem, nebo může být PRDM9 aktivně odstraněn během formování DSBs či synapse (Sun et al., 2015).

PRDM9 u myši určuje pozici hotspotů na autozomech, ale ne na pseudoautozomálním regionu, kde se zdá být lokalizace hotspotů nezávislá na PRDM9 (Brick et al., 2012).

PRDM9 a hybridní sterilita

Gen *Prdm9* je v myším genomu lokalizován na chromozomu 17 a je prvním genem, který byl identifikován jako gen hybridní sterility u obratlovců (Mihola et al., 2009).

Hybridní sterilita je jev, kdy dvě rodičovské formy (samy o sobě fertilitní) produkují potomstvo se sníženou plodností (Dobzhansky). Podle Haldanova pravidla má na tento jev vliv pohlaví, které je ve sterilních potomcích častěji heterogametické.

Bylo zjištěno, že *Prdm9* je jedním z genů, které jsou zodpovědné za meiotickou zástavu u sterilních myších hybridů. Tito hybridy vznikají křížením dvou laboratorních kmenů odvozených od dvou různých myších poddruhů (Mihola et al., 2009). Kmen PWD/Ph (zkráceně PWD) je původem z poddruhu *Mus musculus musculus* (S. Gregorová & Forejt, 2000), kmen B6 pochází zejména z poddruhu *Mus musculus domesticus* (Yang et al., 2007).

Křížením – (PWD x B6)F1 (samička z kmene PWD se samečkem B6) vznikající samčí hybridy vykazují fenotyp podobný homozygotům pro *Prdm9^{tm1Ymat}* alelu. Myši jsou sterilní, s pachytenní zástavou spermatogeneze, s občasnými přežívajícími primárními spermatocyty (ve stádiu diakineze, metafáze I) ve varlatech. Tyto spermatocyty vykazovaly časté chyby v párování homologů i disociaci pohlavních chromozomů (Mihola et al., 2009). Stejně jako myši homozygotní pro nulovou alelu *Prdm9* byly i u hybridů pozorovatelné chyby ve formování XY tělíska (defektní lokalizace fosforylovaného H2AFX) u pachytenních spermatocytů (v 60% jader oproti 7% u fertilitních kontrol) (Mihola et al., 2009). Zajímavé je, že reciproci hybridy (B6 x PWD)F1 jsou semi-fertilitní – mají přítomné spermie v nadvarlatech a produkují potomky (Mihola et al., 2009, Flachs et al., 2012). Vzhledem k tomu, že se fenotypový projev homozygotní delece *Prdm9* týká obou pohlaví, ale hybridní sterility pouze samců, je hybridní sterilita pravděpodobně výsledkem epistatické interakce více genů, ne jen pouze *Prdm9* (Mihola et al., 2009). Jedním z interagujících lokusů je pravděpodobně *Hstx2* lokalizovaný na X chromozomu (Bhattacharyya et al., 2014).

Při nahrazení exonu 10 kódujícího doménu zinkových prstů sekvencí z lidského genu *PRDM9* je u kmene B6 plně zachována fertilita, ale dochází ke změně lokalizace téměř všech hotspotů. U heterozygotní myši nesoucí dvě různé alely – humanizovanou a B6 alelu – byl detekován podobný počet hotspotů jako u homozygotní myši a hotspoty odpovídaly buď jedné, nebo druhé alele. Ve srovnání s homozygoty je B6 alela u heterozygotů méně aktivní. U hybridů (PWDxB6)F1-*Prdm9*^{PWD/H} i reciprokých hybridů (B6 x PWD)F1-*Prdm9*^{H/PWD} nesoucích humanizovanou alelu (H) byla obnovena plná fertilita bez dalších defektů (Davies et al., 2016).

Na snížení či zvýšení fertility může podle Davies et al. mít vliv i symetrie a asymetrie vazby *PRDM9*. Když se *PRDM9* naváže na DNA na jednom chromozomu, může se navázat v odpovídajícím místě na druhém chromozomu (symetrická vazba) nebo se může vázat v místě, které je poněkud odlišné (posunuté – asymetrická vazba) (Davies et al., 2016). Byla nalezena souvislost mezi symetrií vazby *DMC1* a stupněm správné synapse homologů. V případě, že myš nese dvě odlišné alely (nebo při křížení kmenů odvozených od různých poddruhů, např. PWD a B6), dochází ke zvýšení asymetrie vazby *PRDM9* a ke zvýšení množství chyb v synapsi a snížené fertilitě. V myších hybridech s humanizovanou alelou byl pozorován nárůst symetrie a zvýšená fertilita. Je možné, že by se DSBs na asymetrických hotspotech opravovaly pomaleji, na chromozomech s méně symetrickými hotspoty by byla zpožděna oprava DSBs a poté vznikl i vyšší stupeň asynapse, což by mohlo způsobit sníženou fertilitu skrze apoptózu spermatocytů (Davies et al., 2016).

PRDM9 pravděpodobně tvoří homomerní, v případě přítomnosti dvou odlišných alel i heteromerní komplexy, kde pak dvě alely ovlivňují svou aktivitu (Baker et al., 2015). Odlišné alely mají různou afinitu k sekvencím, které rozpoznávají a pokud jsou přítomny dvě různé alely najednou, kompetují spolu o vazebná místa a silnější alela může potlačit modifikaci chromatinu a rekombinaci na hotspotech slabší alely. Také v případě, že se jedna alela váže na svůj hotspot, druhá alela (která by se zde normálně nevázala) může toto místo také methylovat (Baker et al. 2015).

PRDM9 u ostatních organismů

Je zajímavé, že i přes prokázanou roli *PRDM9* u myši a u člověka existují obratlovci postrádající funkční *PRDM9* a jsou přesto fertilní (Baker et al., 2017; Oliver et al., 2009).

U psů, vlků a kojotů je *Prdm9* pseudogenem. Byla zjištěna mutace v genu *Prdm9*, vzniklá pravděpodobně u jejich společného předka, která způsobuje, že nevzniká funkční protein (Muñoz-Fuentes et al., 2011). Rekombinační hotspoty jsou u psů posunuté do oblastí bohatých na CpG, vyskytující se zejména okolo promotorů. V porovnání s myši deficientními pro *Prdm9* se hot spoty zdají být spíše asociovány s obsahem CpG než s H3K4me3 značkami (Auton et al., 2013).

Ještě zajímavější je, že analýzou konkrétní lidské subpopulace s vysokým stupněm příbuznosti byla nalezena žena homozygotní pro nulovou mutaci *PRDM9*, která byla navzdory očekávání fertilní – měla děti. Pokud u ní byl produkován protein, byl zkrácený v SET doméně, tedy postrádající DNA vazebnou doménu (Narasimhan et al., 2016). Zatím není zcela jasné, jak je možné, že je tato žena fertilní.

Interakce proteinu PRDM9 s dalšími proteiny

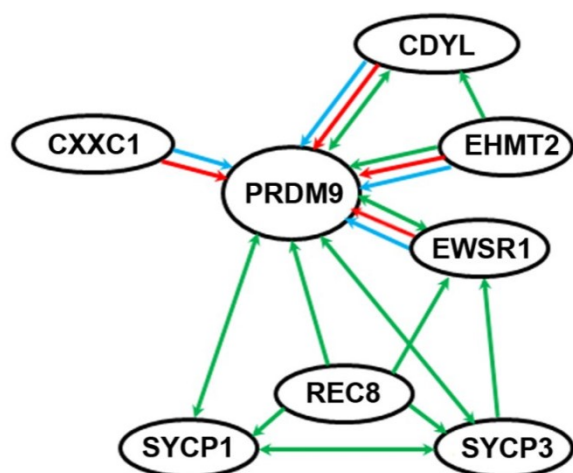
Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému, vazby *in vitro* a koimunoprecipitace proteinů z myších spermatocytů byly identifikovány čtyři proteiny interagující s KRAB doménou PRDM9 (Obr. 2.6): DNA vazebný protein obsahující CXXC doménu – CXXC1 (*CXXC domain-containing 1*), protein, který váže jednořetězcovou RNA a DNA – EWSR1 (*Ewing sarcoma 1*), histon-methyltransferáza katalyzující tvorbu H3K9me1, H3K9me2 a H3K56me1 – EHMT2 (*euchromatic histone methyltransferase 2*) a protein rozpoznávající H3K9me2, H3K9me3 a H3K27me3 a možná i histon-acetyláza – CDYL (*chromodomain-containing Y chromosome-like*). Všechny tyto proteiny jsou koexprimované s PRDM9 v časně meiotické profázi I. Interakce PRDM9 s EWSR1, CDYL a EHMT2 *in vivo* vyžaduje vazbu PRDM9 s DNA (Parvanov et al., 2017).

PRDM9 pravděpodobně funguje při vazbě na hot spoty jako dimer (Baker et al., 2015) a mohl by tak tvořit dva různé komplexy PRDM9-EHMT2-CDYL a PRDM9-EWSR1-CXXC1. Také by tyto komplexy mohly být časově odděleny – v preleptotene a leptotene by byl asociovaný komplex PRDM9-CDYL-EHMT2 a ke konci leptotene do konce zygotene komplex PRDM9 s EWSR1 a možná i s CXXC1 (Parvanov et al., 2017).

Byla také detekována asociace těchto komplexů s proteiny SC – SYCP1 a SYCP3 a meiotickým kohezinem REC8. Je tudíž možné, že tyto proteiny hrají roli v přemístění aktivovaných hotspotů k chromozomovým osám (kde probíhá formace DSBs) a jejich stabilizaci. Na tyto komplexy by se pak mohly vázat další faktory, které poté umožňují nasednutí proteinů účastnících se vzniku DSBs a jejich opravy (Parvanov et al., 2017).

Zda tyto proteiny skutečně funkčně interagují s PRDM9 *in vivo*, je zatím nejasné.

Obr. 2.6. Protein-proteinové interakce KRAB domény PRDM9 podle Parvanov et al., 2017 detekované různými metodami



modře – přímé interakce detekované
kvasinkovým dvouhybridním systémem
červeně – přímé interakce detekované
smícháním purifikovaných značených
proteinů a izolací jejich komplexů *in*
vitro
zeleně – interakce detekované
koimmunoprecipitací
šipky – směr detekované interakce
oboustranné šipky – interakce potvrzené
reciprokou koimmunoprecipitací

2.3 piRNA ve spermatogenezi

Transponovatelné elementy

Transpozony (TE) jsou mobilní elementy, které jsou nezanedbatelnou součástí genomů různých organismů. U některých savců (např. u člověka) mohou zaujímat až necelou polovinu genomu (Tab. 2.1). K nejaktivnějším transpozonům u myši patří IAP (intracisternal A particle) ze skupiny LTR retrotranspozonů (LTR = *long terminal repeat*) a rodina LINE1 (L1) patřící k retrotranspozonům bez LTR (Huang et al., 2012).

TE jsou, se svou schopností integrovat se do nových míst v genomu, významným zdrojem genetické variability, a je tudíž i nutné genomy před jejich působením chránit (je ovšem nutné zmínit, že až na výjimky např. *Drosophila*, jsou mutace v genech s následným fenotypovým projevem způsobené migrací TE ve srovnání s ostatními typy mutací méně časté (Kazazian, 2004). Klíčové je to zejména v rámci gametogeneze u zárodečných buněk, kdy by narušení genomu mohlo mít rozsáhlé následky (Huang et al., 2012; Kazazian, 2004).

Z toho důvodu jsou TE po většinu života transkripčně umlčeny. Efektivní represe transkripce je u savců zajištěna CpG methylací. Během vývoje dochází krátce po fertilizaci ke ztrátě CpG methylačních značek. Ty jsou pak *de novo* opětovně vytvářeny a udržovány v somatických buňkách po zbytek života organismu (Lane et al., 2003).

U samců podstupují buňky zárodečné linie demethylaci GpG po migraci PGCs (*primordial germ cells* = primordiálních zárodečných buněk) do embryonálních gonád a po jejich prvotní expanzi ve stádiu prospermatogonií dojde k zastavení buněčného cyklu od 14,5 dpc (*days post coitum* = dnů po oplození) do 2-3 dpp (*days post partum* = dnů po narození). V této době dochází k znovuvytvoření methylačních značek (Aravin et al., 2008). Methylaci zajišťují DNA methyltransferázy DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, z nich klíčová pro *de novo* methylaci v zárodečné linii je zejména DNMT3L (Aravin et al., 2008; Bourc'his & Bestor, 2004). Delece *Dnmt3l* u myši zabrání *de novo* methylaci rozptýlených repetitivních LTR a non-LTR retrotranspozonů a zástavu spermatogeneze v časně profázi I (Bourc'his & Bestor, 2004).

K ochraně zárodečných linií před nekontrolovaným kopírováním TE přispívá jeden z typů RNA interference – dráha piRNA.

Tab. 2.1. Mobilní elementy u člověka a myši (podle Kazazian, 2004)

Organismus	DNA transpozony (% genomu)	LTR retrotranspozony (% genomu)	Non-LTR retrotranspozony (% genomu)	Aktivní elementy
člověk	3	8,5	35	Non-LTR retrotranspozony
myš	0,9	10	27	LTR-retrotranspozony Non-LTR retrotranspozony

LTR = long terminal repeat

piRNA dráha a PIWI proteiny

piRNA (Piwi-interacting RNA) je třída malých RNA, které pravděpodobně formují komplexy s PIWI proteiny a fungují jako sekvenčně specifické naváděče *de novo* methylačních komplexů ke specifickým místům v genomu (např. transpozonům) (Aravin et al., 2008). Od ostatních malých RNA jsou odlišitelné délkou – piRNA jsou dlouhé 26-31 nt, miRNA (*micro RNA*) a siRNA (*short interfering RNA*) jsou se svými 21-23 nt kratší (Aravin et al., 2006).

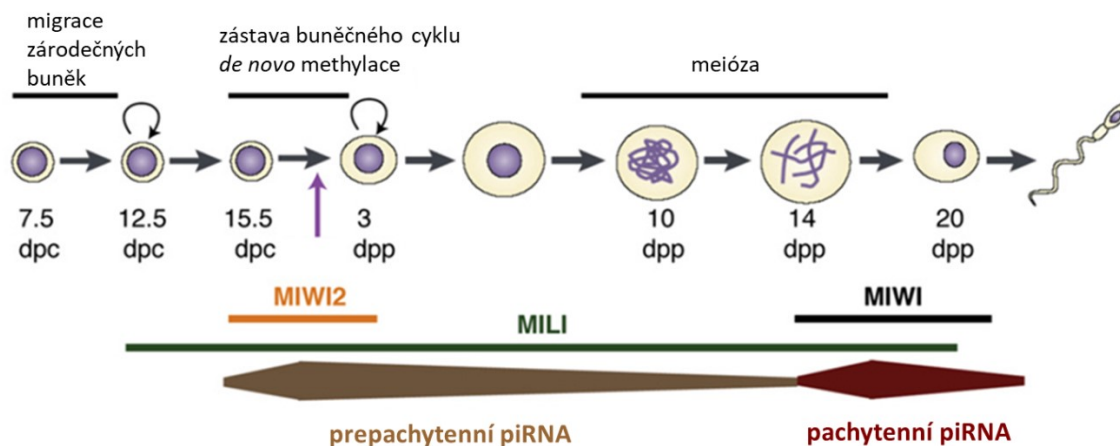
PIWI proteiny obsahují čtyři domény – MID, PAZ, PIWI a N-terminální. Funkcí N-terminální domény je regulace katalytické aktivity proteinu a rozvolňování RNA duplexu. MID doména zajišťuje inkorporaci a stabilizaci 5'konce interagující RNA. PAZ doména inkorporuje 3'konec RNA a určuje délku asociující RNA. PIWI doména má strukturu podobnou RNáze H s konzervovaným katalytickým místem s endonukleolytickou aktivitou, pomocí něhož mohou proteiny umlčovat komplementární cíle (Fu & Wang, 2014).

U savců byly identifikovány tři geny kódující PIWI proteiny - *Miwi* (*Piwi1*), *Mili* (*Piwi2*) a *Miwi2* (*Piwi4*), odpovídajícími produkty těchto genů jsou pak proteiny MIWI, MILI a MIWI2 (dle genetické nomenklatury PIWIL1, PIWIL2 a PIWIL4) (Aravin et al., 2008). PIWI proteiny jsou u myši specificky exprimované v zárodečné linii a jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze (Aravin et al., 2006; Carmell et al., 2007; Deng & Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004).

Exprese MILI začíná od 12,5 dpc a pokračuje po narození až do pachytene (Aravin et al., 2006; Aravin et al., 2008; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004). U dospělých samců je ve varlatech detekovatelné až do stádia kulatých spermatid (Aravin et al., 2008). MIWI je exprimováno od pachytene (od 14 dpp) až do stádia kulatých spermatid (Deng & Lin, 2002). MIWI2 je detekovatelné v samčích zárodečných buňkách od 15,5 dpc do 3 dpp (Aravin et al., 2008). Exprese MILI a MIWI se překrývá v pachytene, doba překrývající se

exprese MILI a MIWI2 odpovídá expresi MIWI2 – od 15,5 dpc do 3 dpp (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004), kdy také probíhá *de novo* methylace DNA (Obr. 2.7) (Aravin et al., 2008).

Obr. 2.7. Exprese PIWI proteinů během spermatogeneze



PGCs domigrují do gonád okolo 11,5-12,5 dpc a dělí se do zástavy buněčného cyklu v 15,5 dpc. Exprese MILI byla detekována od 12,5 dpc, kdy MILI v PGCs lokalizuje do četných perinukleárních cytoplasmatických granulí (podobné jako „nuage“, které obsahují piwi proteiny u *Drosophila*). MILI je exprimováno až do pachytene, v dospělých varlatech až do stádia kulatých spermatid, kde je lokalizované v jedné granuli - „chromatoid body“. MIWI2 se objevuje od 14,5-15,5 dpc v jádře i v cytoplasmě. Po narození (fialová šipka) jeho exprese poklesne a ve 4 denní myši už není detekovatelné (Aravin et al., 2008). Začátek exprese MIWI je ve 14 dpp a pokračuje až do stádia kruhových až elongovaných spermatid (Deng & Lin, 2002)

Dělení buněk je pak obnoveno ve 3 dpp po narození a meiotické dělení je pak zahájeno okolo 10 dpp. První pachytenní buňky jsou viditelné ve 14 dpp, první haploidní kulaté spermatidy okolo 20 dpp. Podle Aravin et al., 2008, upraveno

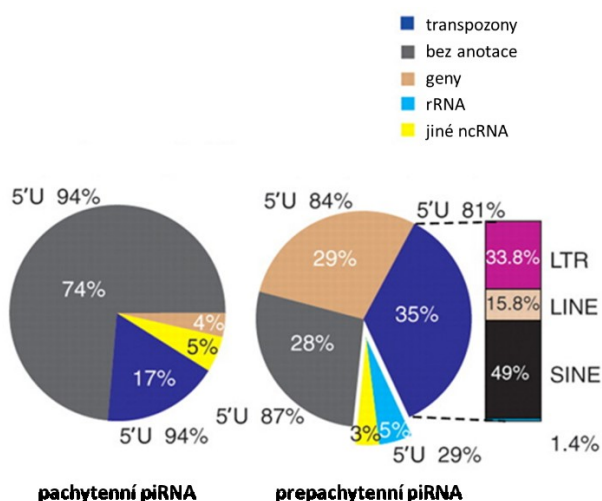
PIWI proteiny interagují se dvěma třídami piRNA – prepachytenní piRNA a pachytenní piRNA (Aravin et al., 2006). Prepachytenní piRNA jsou přítomny před narozením ve prospermatogoniích a po narození ve spermatogoniích, pachytenní piRNA se objevují ve spermatocytech v pachytene a jsou přítomné až do stádia kulatých spermatid (Obr. 2.7) (Fu & Wang, 2014).

Prekursor piRNA jsou pravděpodobně dlouhé primární transkripty, které jsou pak dále zpracovány za vzniku funkčních piRNA (Aravin et al., 2006). Na základě genomického mapování bylo identifikováno množství genomických klastrů (Obr. 2.8) odpovídajících různým piRNA (Aravin et al., 2006). Prepachytenní piRNA mapují do různých oblastí genomu - 35% prepachytenních piRNA odpovídá repetitivním, zvláště transpozonomům (SINEs, LINEs, LTR retrotransposony), 29% mapuje do genových sekvencí (intronů i exonů), ostatní do neanotovaných sekvencí (Aravin et al., 2006). Pachytenní piRNA také obsahuje různé repetice, ale většina (80%) mapuje do unikátních míst genomu.

Pachytenní klastry jsou oproti prepachytenním větší a každý produkuje větší frakci populace piRNA než prepachytenní (Aravin et al., 2006).

Bylo identifikováno (Li et al., 2013) 84 genů produkujících prepachytenní piRNA, 100 genů pro pachytenní piRNA a ještě 30 genů nazvaných jako „hybridní“, které vykazují znaky typické pro prepachytenní i pachytenní piRNA (sekvence a doba transkripce). Transkripty odpovídající prepachytenním a pachytenním piRNA nejsou striktně časově odděleny; exprese prepachytenních genů pokračuje i v pachytenních spermatocytech a kruhových spermatidách. Před pachytene v buňkách převládají piRNA vázané na MILI, během pachytene a v kulatých spermatidách převládají piRNA asociované s MIWI (Li et al., 2013).

Nascentní transkripty piRNA genů jsou generovány RNA polymerázou II. Transkripci pachytenních piRNA genů reguluje faktor MYBL1 (viz. dále; Li et al., 2013).



Obr. 2.8. Porovnání pachytenních a prepachytenních piRNA

Anotace ke genomickým sekvencím dvou populací piRNA s indikovanou frakcí piRNA obsahujících 5'U. Prepachytenní piRNA jsou spíše obohaceny o transpozonové sekvence, pachytenní piRNA mapují spíše do unikátních sekvencí genomu. rRNA – ribozomální RNA, ncRNA – nekódující RNA podle Aravin et al. 2006

3. 3. Biogeneze piRNA

PiRNA může vzniknout dvěma způsoby – primárním („*primary processing*“) a sekundárním – amplifikací primárních piRNA (Obr. 2.9) tzv. ping-pong cyklem („*ping pong cycle*“).

Prekurzorové jednořetězcové transkripty pre-piRNA jsou endonukleolyticky štěpeny za vzniku 5'konců, kde se nachází preferenčně uracil (5'U) (Aravin et al. 2006, 2007). Štěpený prekurzor poté asociuje s PIWI proteinem, kde dochází k dalšímu štěpení - 3'konce, podle délky asociujícího PIWI proteinu (Aravin et al., 2007). Pachytenní piRNA jsou produkovány pravděpodobně pouze tímto mechanismem (Beyret et al., 2012; Aravin et al. 2008).

Část prepachytenních piRNA je produkována druhým mechanismem - pomocí amplifikace primárních piRNA. K ping-pong cyklu jsou kromě primárních piRNA (sense

orientace) potřebné transkripty komplementární (antisense) k primárním piRNA. Po rozpoznání tohoto komplementárního transkriptu komplexem primární piRNA-PIWI proteinem dojde ke štěpení transkriptu endonukleázovou aktivitou PIWI proteinu 10 nt od 5' konce primární piRNA. Vznikne tak 5' konec sekundární piRNA a na 10. pozici je kvůli blízkosti komplementarity s primární piRNA s velkou pravděpodobností adenin (10A) (Aravin et al., 2007).

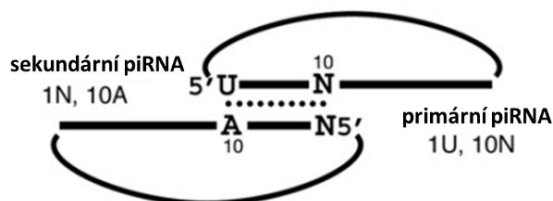
Sekundární piRNA mohou také vstupovat do ping-pongového cyklu a být předlohou pro další sekundární piRNA. Primární piRNA tedy obsahují 1U (5'U) a sekundární 10A (A na desátém nukleotidu) (Brennecke et al. 2007; Aravin et al., 2007).

U myši v ping-pongovém cyklu kooperují MILI i MIWI2 (Aravin et al., 2008). MILI váže spíše sense primární a 1U obsahující piRNA. MIWI2 oproti tomu váže spíše sekundární antisense piRNA (Aravin et al., 2008). Komplexy se liší i délkou asociujících piRNA - MILI asociuje s piRNA dlouhou 26 nt (Aravin et al., 2007), MIWI2 s piRNA o délce 28 nt (Aravin et al., 2008), MIWI s piRNA dlouhými 30 nt (Reuter et al., 2011). Komplexy s MILI a MIWI2 vážou piRNA derivované z transpozonových sekvencí, které tvoří - 72% MIWI2 komplexů a 45,7% MILI komplexů. MILI komplexy také obsahují piRNA derivované z exonů a protein kódujících genů (Aravin et al., 2008).

Prekurzory piRNA mohou vzniknout buď přepisem z piRNA klastrů (viz. výše) nebo to mohou být sense transkripty – tedy často mRNA aktivních transpozonů. Takto vzniklé primární sense piRNA asociující s MILI rozpoznávají a štěpí transkripty obsahující antisense transpozonové sekvence a vznikají tak sekundární piRNA, které vytvořejí komplex s MIWI2 (Aravin et al., 2008).

Obr. 2.9. Biogeneze piRNA

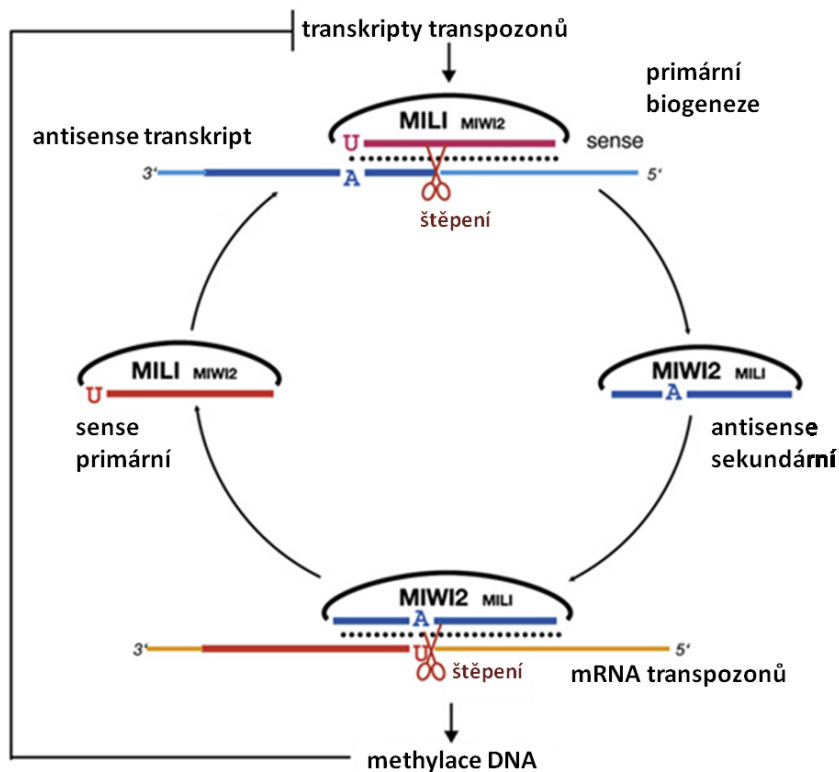
A. Schéma ping-pongového páru



Primární piRNA je sense orientace a nese charakteristické U na pozici 1, u sekundárních antisense piRNA je na 10. pozici A. Primární a sekundární piRNA jsou alespoň částečně vzájemně komplementární s přesahy na 5' koncích.

(Aravin et al., 2008)

B. Model ping-pongového cyklu u myši



Prekurzory primární biogeneze jsou buď transkripty z piRNA klastrů nebo mRNA aktivních transpozónů. Z těchto transkriptů vzniká primární biogenezí sense piRNA, které preferenčně asociuje s MILI. Sekundární biogeneze zahrnující ping-pongový cyklus dále amplifikuje piRNA za účasti MILI i MIWI2. MIWI2 asociuje preferenčně s antisense piRNA. Po skončení exprese MIWI2, poté v cyklu funguje pouze MILI. Antisense piRNA potom pravděpodobně navádí nukleární komplexy k DNA methylaci transpozónů v jádře (Aravin et al., 2008).

Projevy deficience funkčních PIWI proteinů

Defekty v piRNA dráze zabrání rozpoznávání a umlčování transpozónů pomocí methylace DNA.

Myši deficientní pro MILI nebo MIWI2 vykazují zvýšenou expresi transpozónů a defekty ve spermatogenezi, což způsobuje sterilitu samců (Carmell et al., 2007; Aravin et al., 2007)

Myši samci homozygotní pro nulovou alelu *Miwi2* (*Piwi4^{tm1Ghan}* – gen byl přerušen vektorem obsahujícím exony 9-12, což vedlo k vložení několika stop kodonů a tvorbě nefunkční alely genu) měli menší varlata (ve srovnání s nemutovanými kontrolami), meiotickou zástavu v leptotene-zygotene a tudíž byli sterilní. V tubulech se vyskytovaly spermatocyty s abnormální morfologií. Se stárnutím myši se zvyšovalo množství apoptotických buněk v semenotvorných kanálcích a snižovalo se množství spermatogonií i abnormálních spermatocytů (ztráta zárodečných buněk) a okolo 3 měsíců věku se začaly

objevoval tubuly pouze se Sertoliho buňkami, které postupně začaly dominovat. Docházelo i k aktivaci TE ve varlatech – demethylaci LINE-1 elementů a byly detekované transkripty LINE-1 i IAP retrotranspozonů (Carmell et al. 2007).

Delece v genu kódujícího MIWI (alela *Piwi1*^{tm1Hfl} – nahrazení exonů 3-22 neo kazetou, vzniká produkt fúzovaný s GFP po prvních 9 aminokyselinách kódovaných *Piwi1* genem) se u samců projevuje zástavou spermatogeneze ve stádiu kulatých spermatid; MIWI zřejmě hraje roli ve spermiogenezi. Dospělí samci měli redukovanou velikost varlat a zvýšenou apoptózu spermatocytů a byli sterilní (Deng & Lin 2002).

Myši samci deficientní pro *Mili* (alela *Piwi2*^{tm1Nkn} – exony 2-5 byly nahrazeny neomycinovou kazetou, došlo k deleci aminokyselin 1-209) byli také sterilní. Měli zástavu spermatogeneze v profázi I od zygotene do časně pachytene. Po této fázi byla pozorovaná vysoká apoptóza spermatocytů. Přestože je MILI exprimované v PGCs, vývoj PGCs nebyl ovlivněn. Váha varlat byla u homozygotů (70 dpp myši) pětinná ve srovnání s kontrolami. V pachytenních spermatocytech nebyla detekovaná exprese *Miwi* (možná kvůli absenci popachytenních spermatocytů a kulatých spermatid exprimujících MIWI) a slabší byla exprese i *Sycp1*, *Sycp3* a *Myb11* (viz.dále). V myších deficientních pro *Miwi* je ale normální hladina exprese *Mili* (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). V myších nesoucích mutaci v *Mili* byla také zvýšená hladina exprese transpozonů a ztráta methylace jejich sekvencí (Aravin et al. 2007, Aravin et al. 2008).

Je zajímavé, že sterilita kvůli deletovaným myším PIWI proteinům postihuje pouze samce. Ve všech třech výše zmíněných případech deletovaných alel – *Mili*, *Miwi*, *Miwi2* – byly samičky fertillní (Deng & Lin 2002, Kuramochi-Miyagawa et al. 2004, Carmell et al. 2007, Aravin et al. 2007).

Existují i deletované alely genů pro *Mili* a *Miwi2*, které cílí do katalytické triády PIWI domény zajišťující endonukleázovou aktivitu proteinů (De Fazio et al., 2011).

Alela *Mili*^{DAH} (*Piwi2*^{tm1.1Doca} – nahrazení exonu 21 exonem s bodovou mutací, kde došlo k nahrazení kodonu aminokyseliny – D813A) pravděpodobně způsobí zrušení endonukleolytické aktivity MILI, ale nemá vliv na jeho expresi ani na jeho lokalizaci v buňce. Varlata u *Mili*^{DAH} myši jsou atrofická a samci jsou sterilní. 70% *Mili*^{DAH} myších samců vykazovalo závažný fenotyp, s meiotickou zástavou v pachytene, podobný deleci *Mili* (viz výše). Zbýlých 30% myši mělo méně závažný fenotypový projev, byly přítomny tubuly s kulatými i elongovanými spermatidami. Rozdílné fenotypy mohly vzniknout buď tím, že MILI a jeho endonukleázová aktivita má ještě jinou funkci ve spermatogenezi kromě umlčování transpozonů nebo může mít vliv genetické pozadí (De Fazio et al. 2011).

Alela *Mili*^{DAH} byla udržována na smíšeném 129 a C57BL/6 pozadí (De Fazio et al., 2011) a je možné, že výsledný fenotyp může záviset na kombinaci alel jiných genů pocházejících z různých myších kmenů.

V tubulech homozygotů pro mutantní alelu byla pozorována vysoká úroveň apoptózy a i buňky s netypickou morfologií. U myši došlo k derepresi L1 elementů, ale ne IAP, které jsou na rozdíl od MILI deficientních myši normálně methylovány a reprimovány. Endonukleázová aktivita MILI je tedy zřejmě nezbytná k umlčování L1 elementů. Mutace *Mili*^{DAH} pravděpodobně nemá vliv na primární biogenezi piRNA ani na expresi piRNA z genomických klastrů a transpozonových sekvencí, dochází ale pravděpodobně k chybám v iniciaci sekundární biogeneze - amplifikace piRNA ping-pongovým cyklem. Dochází i k redukcí piRNA vázaných proteinem MIWI2 (De Fazio et al. 2011).

Byla vytvořena i *Miwi2*^{DAH} alela (*Piwi14tm1.1Doca* – nahrazení exonu 17 modifikovaným exonem s aminokyselinovou substitucí D761A). Tyto myši byly ovšem fertlní, bez pozorovaných defektů ve varlatech. L1 i IAP byly methylovány a také jejich exprese reprimována. Nebyl pozorován žádný úbytek zárodečných buněk ani změny v populaci piRNA (De Fazio et al. 2011).

Endonukleázová aktivita MILI inciuje sekundární biogenezi piRNA a je vyžadována pro amplifikaci piRNA asociujících s MILI i MIWI2 nutných k represi transpozonových sekvencí, zejména L1. Je možné, že pro represi IAP jsou dostačující pouze MIWI2-asociující piRNA, protože IAP sekvence nejsou v genomu tolik zastoupeny (De Fazio et al. 2011).

I další studie potvrzují rozdílnou funkci MILI a MIWI v umlčování transpozonů. Oba proteiny se podílejí na umlčování neaktivnějších LINE1 elementů a oba se podílejí na sekundární biogenezi. Ovšem MIWI2 je pro ping-pongový cyklus postradatelný. MILI má vliv na methylaci transpozonů a funguje částečně nezávisle na MIWI2. MILI váže širší spektrum různých piRNA nutných k umlčování transpozonů a MIWI2 spíše zajišťuje potřebné množství piRNA specifických ke konkrétním aktivním třídám transpozonů (Manakov et al., 2015).

Využití piRNA dráhy pro umlčování genů

Je zajímavé, že prekurzory piRNA vzniklé z transkriptů piRNA klastrů v genomu nejsou pravděpodobně nutné v buňce k iniciaci dráhy biogeneze piRNA jako takové.

K ověření této teorie byly vytvořeny transgenní myši, v jejichž samčích embryonálních zárodečných buňkách byl exprimován gen pro zelený protein, *EGFP*.

Jednalo se jednak o sense *EGFP* pod promotorem pro *Oct4*, jednak antisense *EGFP* pod kontrolou *Miwi2* promotoru. Když byl přítomen pouze jeden transgen, došlo k expresi sense *EGFP* v časovém okně odpovídajícímu expresi *Oct4*, resp. antisense *EGFP* odpovídajícímu *Miwi2*. Naopak v myši, která exprimovala transgeny oba, došlo k zvýšení úrovně methylace obou promotorů i kódujících oblastí obou genů *EGFP*, tedy k umlčení exprese *EGFP*. Exprese EGFP byla obnovena v myších deficientních pro *Mili* i v těch, které neměly funkční MIWI2. Methylace promotorů byla v těchto myších opět nižší v porovnání s pouze dvojitě transgenními myši a i další důkazy (např. „ping-pong signature“) naznačují, že skutečně došlo k cílené methylaci pomocí piRNA dráhy (Itou et al. 2015).

Je zajímavé, že je možné takto specificky umlčovat i expresi endogenních genů v zárodečných buňkách. Po vložení antisense sekvence kontrétního genu pod *Miwi2* promotor dojde k indukci tvorby piRNAs, jejich biogeneze a interakci s MILI a MIWI2 a de novo methylaci sekvence genu. Fenotypový projev je velmi podobný fenotypu myši, která je deficientní pro daný gen.

Transkripce piRNA z piRNA klastrů v genomu není tedy nezbytná pro průběh biogeneze a de novo methylaci genů, stačí pouze, aby byly současně přítomny transkripty sense a antisense sekvence genu.

Tato metoda představuje způsob snížení exprese genu, např. pro geny důležité pro průběh spermatogeneze a je zajímavým nástrojem pro studium epigenetiky (Itou et al. 2015).

Role piRNA dráhy v hybridní dysgenezi u *Drosophila*

Hybridní dysgeneze je forma redukce životaschopnosti a fertility hybridů vyskytující se u octomilky *Drosophila*. Potomci křížení samců nelaboratorních kmenů s laboratorními samicemi jsou sterilní, reciproké křížení laboratorních samců s nelaboratorními samicemi dává fertilní potomky (Brennecke et al., 2008).

Sterilita je způsobena mobilizací aktivních transpozonů – P-elementů nebo I-elementů, které jsou přítomné pouze v nelaboratorních octomilkách a u sterilních potomků jsou tyto elementy v ováriích exprimovány. Křížením samců obsahujících I-element se samičkami bez tohoto elementu vznikají dysgenní samičky. Křížením samiček s I elementem se samci bez něj vznikají fertilní samičky. U sterilních samiček dochází ke zvýšené expresi I-elementu (Brennecke et al., 2008).

Faktory způsobujícími represi transpozonů jsou piRNA, které jsou přenášeny po mateřské linii. V případě, že samička nese I-element, piRNA antisense k transpozonům vzniklé v matce samičce jsou (z oocyty do zygoty) dědičně přenášeny do dcery, kde reprimují expresi transpozonů. Pokud matka samička I-element nenese, a tatínek sameček ano, u dcery není dostupné dostatečné množství piRNA k jeho represi, dojde k jeho zvýšené expresi a výsledkem je sterilita samičky. PiRNA tedy fungují jako maternální supresory hybridní dysgeneze u octomilky *Drosophila* (Brennecke et al., 2008).

2.4 Regulace exprese genů včetně piRNA v pachytene genem *Mybl1*

Pachytenní piRNA

Ve varlatech dospělých myší převažují pachytenní piRNA. Pachytenní piRNA vznikají pouze primární biogenezí (mají značku primární biogeneze – 1U, ale ne sekundární – 10A). Jsou velmi diverzifikované a nejsou obohacené o transpozonové sekvence, spíše lokalizují do intergenových oblastí (Li et al. 2013), tudíž jejich hlavní funkcí pravděpodobně není umlčování transpozonů (Aravin et al., 2007). U myší deficientních pro MIWI bylo zvýšené množství piRNA asociujících s MILI, je tudíž možné, že u pachytenních piRNA se MILI i MIWI účastní primární biogeneze (Beyret et al., 2012). Také je možné, že pachytenní piRNA asociované s MILI a MIWI účastní regulace (na posttranskripční úrovni) různých mRNA důležitých pro spermiogenezi (Aravin et al., 2007; Deng & Lin, 2002). Komplex piRNA s MIWI je pravděpodobně zapojen v degradaci mRNA v elongovaných spermatidách v přípravě na vznik spermií. Tento komplex asociovaný s deadenylázou CAF1 katalyzuje deadenylaci a následnou degradaci různých mRNA (Gou et al., 2014).

Transkripčním faktorem regulujícím transkripci genů důležitých pro průchod pachytene a zároveň i iniciující transkripci genů pro pachytenní piRNA je *Mybl1* (*myeloblastosis oncogene-like 1, A-myb*) (Bolcun-Filas et al. 2011, Li et al. 2013).

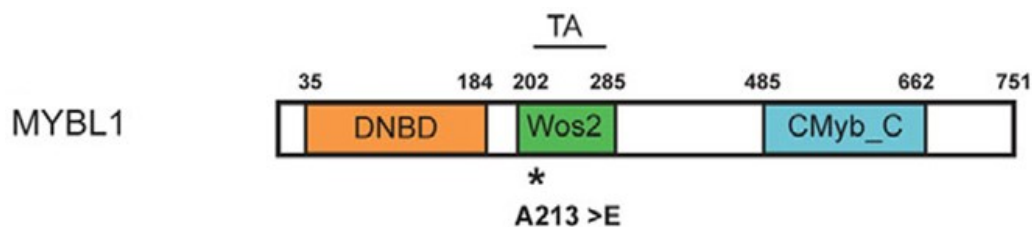
Mybl1 (*A-Myb*)

MYBL1 je transkripční faktor patřící do rodiny Myb genů. Rodina Myb zahrnuje u myší geny pro 3 transkripční faktory – *A-Myb*, *B-Myb* a *c-Myb* (*Mybl1*, *Mybl2* a *Myb*), kódující proteiny MYBL1, MYBL2 a MYB. Jsou to DNA vazebné proteiny fungující jako transkripční faktory různých genů hrajících roli v řadě různých procesů (např. buněčné dělení a buněčnou diferenciaci, proliferaci, apoptózu). Jejich N-koncová doména skládající se ze 3 tandemových repetice (*Myb repeats* = Myb repetic) specificky váže DNA (Obr. 2.10), uprostřed proteinu je transaktivační doména, konzervovaná doména na C-konci je regulační (Campanini et al., 2015).

MYBL1 je ve varlatech u myší exprimován od 12 dpp (první výskyt pachytenních spermatocytů), od začátku pachytene (Bolcun-Filas et al., 2011). Kromě reprodukčních tkání je exprimován v lymfoidních tkáních, transkripty byly detekovány i v mozku, srdci, plicích, a ledvinách (Trauth et al., 1994). U samců způsobuje delece *Mybl1* zástavu

spermatogeneze během meiózy v pachytene a u samic defektní proliferaci a morfologii prsní tkáně (Toscani et al., 1997).

Obr. 2.10. Struktura proteinu MYBL1 s mutací *repro9*



DNBD – Myb repetece; DNA vazebná doména; TA – transaktivační doména; C_Myb_C – C-terminální regulační doména; Wos2 – doména asociovaná s regulací transkripce buněčného cyklu

Mutace *repro9* se nachází v transaktivační doméně.

(Bolcun-Filas et al., 2011; Trauth et al., 1994)

Myši deficientní pro *Mybl1* (alela *Mybl1^{tm1Epr}* – vložení neomycinové kazety do exonu 4 byl přerušen gen *Mybl1*, došlo k poškození části genu kódující DNA vazebnou doménu) měly defektní postavení těla – byli v prvních týdnech po narození menší, svažštější a nahrbenější (ve srovnání s kontrolami). U většiny myši se parametry těla okolo 4 měsíců po narození vrátily k normálu a dosáhly velikosti svých heterozygotních a kontrolních sourozenců. Samci homozygotní pro mutaci byli sterilní se zástavou v časně pachytene. Měli redukovanou velikost varlat (25%-ní ve srovnání s myšáky bez mutace), tubuly byly menší a byl v nich pozorován velký rozsah apoptózy. Spermatogonie a pre-leptotenní spermatocyty byly normální, ale pachytenní spermatocyty vykazovaly různý stupeň degenerace od jaderných změn až po rozpad buněk. V tubulech nebyly přítomny žádné postmeiotické typy buněk – spermatidy ani spermie. Samičky byly schopné porodit potomky, ale vyskytovaly se u nich defekty v proliferaci a formaci prsní tkáně a nebyly schopné kojit mláďata (Toscani et al. 1997).

Druhá alela měnící funkci genu *Mybl1* je *Mybl1^{repro9}* (ENU mutagenézí byla vytvořena bodová mutace (C893A), způsobující nekonzervativní záměnu aminokyselin A213E; (Bolcun-Filas et al., 2011; Wilson et al., 2005) a fenotyp je specifický pro samce. Nemění expresi genu *Mybl1* a jedná se o hypomorfni mutaci nebo alelu separující funkci (*separation-of-function*), která pravděpodobně postihuje pouze funkci genu ve spermatogenezi. Myši samci nesoucí tuto mutantní alelu v homozygotním stavu jsou sterilní, s meiotickou zástavou v časně pachytene. Samičky byly oproti tomu zcela fertilní a

(na rozdíl od alely *Mybl1^{tm1Epr}*) bez problémů odkojily mláďata. Samci i samičky byli normálního vzrůstu, bez jiných morfologických defektů (Bolcun-Filas et al., 2011).

U samců nepřímé imunofluorescenční barvení (protilátkami proti SYCP1 a SYCP3) jader ukázalo, že 51,2% pachytenních spermatocytů bylo aberantních s asynapsovanými homology (na koncích chromozomů) a nebo asynapsemi v oblasti pseudoautozomálního regionu pohlavních chromozomů. Přestože mnoho chromozomů ve spermatocytech bylo v pachytenní synapsi, nebyly pozorovány typické diplotenní buňky s viditelnými chiasmaty, ale spíše diplotenní chromozomy s různými defekty, včetně abnormálních XY tělísek (Bolcun-Filas et al., 2011).

K DSBs dochází a je iniciována i jejich oprava, ale není správně dokončena za vzniku CO (určeno pomocí barvení RAD51, γ H2AX a MLH3). Analýza transkriptomu pomocí mikročipů u homozygotů pro mutaci *repro9* a u kontrol odhalila množství genů, které byly u homozygotů dysregulovány a pomocí Chip-chip analýzy byly detekovány potenciální geny přímo regulované MYBL1. Bylo identifikováno 21 genů, z nich 14 obsahovalo MYB-vazebná místa (Bolcun-Filas et al., 2011).

Patří k nim geny související s regulací buněčného cyklu a vstupem do meiózy – cyklíny (*Ccnb3* a *Ccng1*) a kinázy (*Nek2* a *Nek4*); se spermatogenezí a její regulací (*Meig1*, *Piwill1*, *Clgn*, *Ldhc*, *Brdt*, *Crem* a *Mak*), mutace v těchto genech vykazuje fenotypy postmeiotické infertility; geny související s průchodem samčí meiózou (*Morc2b*, *Aym1* a *Rfx4*) (Bolcun-Filas et al., 2011).

Morc2b (*microrchidia 2B*) kóduje protein specifický pro gonády a byla detekována jeho snížená exprese v myších deficientních pro *Prdm9*. V této souvislosti byla diskutována možnost funkce PRDM9 jako transkripčního faktoru, což se dosud nepotvrdilo (Mihola et al., 2009), ale Chip-seq analýza odhalila vazbu PRDM9 na některých promotorech (Grey et al., 2017).

Dále bylo zjištěno, že MYBL1 reguluje i expresi pachytenních piRNA genů i dalších faktorů účastnících se biogeneze piRNA (Li et al., 2013), včetně genu kódujícího MIWI (Bolcun-Filas et al., 2011; Li et al., 2013). K těmto genům pravděpodobně regulovaným MYBL1 souvisejících s piRNA biogenezí patří i geny pro proteiny obsahující doménu Tudor – *Tdrd5*, *Tdrd6*, *Tdrd1*, *Tdrd9*, *Tdrd12* a další geny *MitoPld*, *Ddx39*, *Mael*, *Mov101l* i *Mili*. Tato regulace se zdá být evolučně konzervovaná (Li et al. 2013).

Proteiny TDRD5 a TDRD6 asociují s MIWI, TDRD1 váže MILI i MIWI a lokalizuje s TDRD5 a TDRD6 v komplexu zvaném „chromatoid body“ v buňce (shrnutí v Li et al., 2013).

MYBL1 se kromě vazby na promotory pachytenních piRNA genů a genů piRNA biogeneze se váže i na svůj vlastní promotor a tím vytváří pozitivní zpětnovazebnou smyčku zvyšující množství pachytenních piRNA. V myších nesoucích mutovanou alelu *Mybl1^{repro9}* je množství pachytenních piRNA redukováno. Je možné, že v mutantních varlatech vzniká protein, který je nestabilní, případně se není schopen vázat na svůj vlastní promotor (Li et al., 2013).

Je zajímavé, že v *Mili* deficientních varlatech je snížena exprese *Mybl1* (Kuramochi-Miyagawa et al., 2004).

2.5 Epistáze

Epistáze neboli interakce mezi geny hraje roli v mnoha komplexních biologických drahách.

Geny spolu mohou interagovat různě – funkční epistáze zahrnující přímé interakce mezi genovými produkty – proteiny (a dalšími genetickými elementy) operujícími v rámci jedné dráhy či jsou součástí jednoho komplexu (protein-proteinové interakce). Statistická epistáze řeší efekty kombinace alel na různých lokusech u rozličných genotypů přítomných v populaci. Kompoziční epistáze je pak situace, kdy efekt jedné alely je blokován alelou na jiném lokusu. Tento efekt může být realizován nahrazením jedné alely za jinou na konkrétním genetickém pozadí, takže výsledný pozorovaný efekt je daný pouze změnou v konkrétním lokusu beze změn ve zbytku genetického pozadí. Kompoziční epistáze tedy popisuje způsob, jakým je specifický genotyp složen, a vliv, jaký má specifické genetické pozadí na konkrétní set alel (Phillips, 2008). Do definovaného genetického pozadí lze například zavést deficienci pro dva geny a poté zkoumat jejich fenotyp. Problematické to může být ve chvíli, kdy tento dvojitý mutantní homozygot vykazuje podobný fenotyp jako myši deficientní pro jednotlivé geny samostatně. Mnohem informativnější je proto snížit dávku obou genů – vytvořit dvojitě heterozygoty pro mutantní alely dvou zkoumaných genů a jejich fenotyp pak porovnat s kontrolami (jako ve Snyder et al. 2015).

Snyder et al. (2015) zkoumali funkce genů kódujících dva Y-box proteiny – YBX2 a YBX3. K zjištění jejich funkční redundance se pokusili vytvořit dvojitě homozygoty pro nulové alely obou genů. Ty však nebylo možné křížením myši nesoucích dvě mutantní alely v heterozygotním vytvořit, protože tito složení heterozygoti byli sterilní (haploinsuficience obou genů). Myši deficientní pouze pro jeden z těchto genů *Ybx3* měly redukovanou fertilitu a různé defekty v diferenciaci spermatid, ale u myší, u kterých byla mutace v tomto genu v heterozygotním stavu, nebyl fenotyp pozorován. Snížená dávka obou genů ve dvojitých heterozygotech způsobila fenotyp (redukce počtu spermií, jejich abnormální morfologie a ztrátu represe translace), který nebyl pozorován u jednoduchých heterozygotů, což naznačuje funkční souvislost mezi těmito geny. Mutace jednotlivých genů někdy nevede k výraznému fenotypu, ale v kombinaci s mutací jiného místa je letální; tato složená letalita může vyplývat jak z redundance genů, tak z aditivních nebo synergických efektů (Snyder et al., 2015).

Vyplývá z toho i zajímavý důsledek pro sterilitu člověka – v případě, že má mutovanou alelu v jednom genu, může být bez problémů fertilní, ale v kombinaci s druhou

mutovanou alelou v heterozygotním stavu může způsobit sterilitu jedince dokonce i jedna porušená kopie.

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo zjistit, zda gen *Prdm9* interaguje se dvěma geny hrajícími roli ve spermatogenezi – genem *Mybl1* nebo s genem *Mili* (*Piwil2*). K dispozici byly dvě myší linie a jeden kmen nesoucí tyto mutantní alely: *Prdm9*^{tm1Ymat} na inbredním B6 pozadí, mutaci *Mili*^{DAH} na smíšeném genetickém pozadí (B6 se 129) a alelu *Mybl1*^{repro9} na smíšeném pozadí B6 s C3H.

- Křížením myší nesoucích mutantní alely a genotypizací potomků připravit samce dvojité heterozygotní pro geny *Prdm9* a *Mybl1* i pro *Prdm9* a *Mili* (*Piwil2*).
- Připravit samce dvojité homozygotní pro geny *Prdm9* a *Mybl1*
- U těchto myší i jejich sourozenců – kontrol – určit fertilitní parametry: váhu těla, relativní váhu testes, počet spermií v nadvarlatech, procento semenotvorných kanálků ve varlatech obsahujících jako nejpokročilejší stádium spermatogonie, spermatocyty, kulaté a elongované spermatidy.
- U křížení s mutací *Mybl1*^{repro9} určit i procento pachytenních spermatocytů s defekty v synapsi autozomů a ve vytváření XY tělíska.
- Srovnat dvojité heterozygoty i dvojité homozygoty s kontrolami a statisticky vyhodnotit rozdíly.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Myší kmeny

Modelovým organismem použitým pro pokusy v této práci je myš domácí (*Mus musculus*). Ke křížení byly použity inbrední laboratorní kmeny odvozené od dvou myších poddruhů – kmen C57BL/6J (B6, B6J, Black 6, C57 Black; dále B6) byl odvozen z poddruhu *Mus musculus domesticus* a kmen PWD/Ph (Prague Wild D, dále PWD) od poddruhu *Mus musculus musculus*.

Kmen B6 byl vytvořen v The Jackson Laboratory v USA, odkud byl v roce 1998 dovezen do chovů zvěřince Ústavu molekulární genetiky (IMG). Jedná se o laboratorní kmen, který je v současné době ve výzkumu široce používán (Yang et al., 2007; Gregorová et al., 2008; <https://www.jax.org/strain/000664>). Kmen PWD vznikl opakovaným sourozeneckým křížením páru myší odchyceného v okolí Prahy v 70. letech 20. století. Od té doby je udržován ve zvěřinci Ústavu molekulární genetiky. Kmen PWD se od laboratorních kmenů (C57BL/10) liší fenotypovými znaky (váha těla, distribuce tuku v těle, rozdíly v chování, hladinou intermediálních metabolitů v krvi) i množstvím sekvenčních polymorfismů (mikrosatelitů i SNP) v genomu (Gregorová & Forejt, 2000).

Mutované alely a delece genů

Myš s deletovanou alelou *Prdm9^{tm1Ymat}* byla vytvořena pomocí vektoru obsahujícího gen pro lacZ vloženého do 129P2/OlaHsd embryonálních kmenových buněk. Část vektoru nahradila část exonu 2 (obsahující iniciační kodon), exon 3-6 a část exonu 7 genu *Prdm9*. Myší kmen B6-*Prdm9^{tm1Ymat}* byl pak vytvořen desetinasobným zpětným nakřížením na B6 pozadí myší nesoucích tuto deletovanou alelu (Flachs et al., 2014; Hayashi et al., 2005).

Druhou použitou linií byla linie s mutací (*Piwil2^{tml.1Doca} = Mili^{DAH}*) v genu *Mili* (*Piwil2*). Tato mutace vznikla nahrazením exonu 21 genu *Mili* (kódujícím část PIWI domény proteinu – exony 20-23) modifikovaným exonem s bodovou mutací. Tato jednonukleotidová substituce způsobila změnu kódované aminokyseliny – z kyseliny asparagové na alanin. Touto aminokyselinovou substitucí je ovlivněna pouze endonukleázová aktivita proteinu PIWIL2, ale nemá vliv na jeho stabilitu, lokalizaci ani další funkce (De Fazio et. al., 2011).

Další linie nesla mutaci *Mybl1^{repro9}*. Ta vznikla mutagenézí B6 pomocí ENU (= ethylnitrosourea) (Wilson et al., 2005; součást programu ENU mutageneze sloužící k identifikaci genů způsobujících neplodnost). Tyto myši byly dále postupně kříženy, výsledná mutace byla na smíšeném C3HeB/FeJ (C3H) x B6 genetickém pozadí. Jedná se opět o bodovou mutaci vzniklou jednonukleotidovou transverzí, to způsobilo substituci jedné aminokyseliny, tentokrát alaninu na glutamovou kyselinu (A213E) (Bolcun-Filas et al., 2011).

Myši nesoucí *Piwil2^{tm1.1Doca}* a byly poskytnuty P. Svobodou za laskavého svolení D. O'Carroll. *Mybl1^{repro9}* myši nám poskytl J. C. Schimenti.

Myši nesoucí mutaci *Piwil2^{tm1.1Doca}*, které jsme měli k dipozici, nesly ještě navíc mutaci genu *Dicer1* - *Dicer1^{em3Psv}* (Flemr et al., 2015). U této mutace se jedná o deleci jedné z izoform genu *Dicer1*, která je specifická pro oocyty. Tato delece neovlivňuje funkci *Dicer1* v somatických buňkách ani v samčí zárodečné linii (Flemr et al., 2013), proto by na fenotyp samců neměla mít vliv. Všechny myši z křížení týkajícího se genu *Mili* (*Piwil2*) byly ale na tuto mutaci otestovány a vzhledem k tomu, že mutace neovlivňovala fertilitní parametry samců, byly pro analýzu použity myši s touto mutací i bez ní. Charakteristiky mutantních alel genů použitých v této práci jsou shrnuty v Tab. 4.1.

Tab. 4. 1. Mutované alely genů

Gen	Alela	Genetické pozadí	Popis	Reference
<i>Prdm9</i>	<i>Prdm9^{tm1Ymat}</i>	B6	delece části genu <i>Prdm9</i> – exonů 2-7, včetně iniciačního kodonu	http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:3623909 Hayashi et al., 2005 Mihola et al., 2009 Flachs et al., 2012, 2014 Brick et al., 2012 Baker et al., 2015 Sun et al., 2015
<i>Mili</i> (<i>Piwil2</i>)	<i>Mili^{DAH}</i> (<i>Piwil2^{tm1.1Doca}</i>)	smíšené pozadí 129 x B6	mutace D813A v PIWI doméně proteinu MILI	http://www.informatics.jax.org/allele/key/818620 De Fazio et al., 2011 Di Giacomo et al., 2013
<i>Mybl1</i>	<i>Mybl1^{repro9}</i>	smíšené pozadí C3H x B6	mutace A213E v transaktivační doméně proteinu MYBL1	http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:3512907 Bolcun-Filas et al., 2011 Li et al., 2013

Chov myši

Část myši byla chována v prostorách zvěřince Ústavu molekulární genetiky (Institute of Molecular Genetics – IMG) v Praze v Krči, část v chovech Českého centra pro

fenogenomiku (Czech Center for Phenogenomics - CCP) v BIOCEVu ve Vestci u Prahy. Chov v obou těchto zvěřincích je bariérový (Specific Pathogen-Free Facility). Myši byly chovány v kontrolované teplotě 22°C, vlhkosti 55% a cyklu světlo/tma 12h/12h. Měly volný přístup k acidifikované vodě a ke krmení (Altromin 1314, Altromin 1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG).

Myši jsou evidovány v aplikaci PyRAT (Python Based Relational Animal Tracking). Veškerá komunikace s ošetřovateli (připouštění myší, vytažení myší z chovu, usmrcení myší, odběr tkáně) byla prováděna přes tuto aplikaci.

Statistické zpracování výsledků

Data byla vyhodnocena Welchovým t-testem v programu Microsoft Office Excel. Parametry testu byly nastavené na oboustranné rozdělení a porovnávání dvou parametrů s různým rozptylem. Byl zvolen 95% interval spolehlivosti, odpovídající hladině významnosti 0,05.

4.2 Metody

4.2.1 Určování genotypu

Izolace myší genomické DNA

DNA byly vyizolovány metodou HotSHOT (Hot Sodium Hydroxide and Tris) (Truett et al., 2000). Tato metoda je rychlá a poskytuje DNA dostatečně kvalitní pro PCR reakci.

Malý kousek ocasní tkáně myši (o délce cca 1-2 mm) byl vložen do 1,5ml mikrozkuhavky se 600 μ l 50 mM NaOH. Vzorek byl následně inkubován při 95°C po dobu 1,5 hodiny. Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 50 μ l 1M Tris-Cl (pH = 8,0) a vzorek byl centrifugován (Eppendorf Centrifuge 5424 R) po dobu 6 minut při 16 300 g a 20 °C. Vyizolovaná DNA zůstala v roztoku. 1-2 μ l roztoku s DNA byly použity jako templát přímo do PCR reakce.

Složení, primery a podmínky PCR reakce

Jednotlivé složky PCR reakce byly smíchány na ledu podle Tab. 4.2. (sekvence použitých primerů v Tab. 4.3). PCR reakce probíhala v přístroji Biometra TProfessional Standard 96 Gradient (podmínky PCR reakce v Tab. 4. 4. A-D).

PCR produkty byly rozděleny na 2% (w/v) agarozovém gelu (výjimka – 2,5% gel u *Mili^{DAH}*), k vizualizaci produktů byla použita barvička Midori Green Advance, přimíchaná přímo do gelu.

Agaróza byla rozpuštěna ve 400 ml 0,5xTBE pufru, po rozpuštění agarózy bylo do gelu přimícháno 16 μ l Midori Green Advance. K PCR produktům bylo přidáno cca 10 % (v/v) nanášecí barvičky s Orange G a tato směs byla nanesena na gel. Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně Bio-Rad Sub-Cell® Model 96 Cell (zdroj Amersham Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 301) při napětí 8,4 V.cm⁻¹ po dobu 1 hodiny pro *DicerI^{em3Psv}* a *Mili^{DAH}* a 25 min. pro *Prdm9^{tm1Ymat}* a *Mybl1^{repro9}*.

K získání obrazové dokumentace a vyhodnocení gelů byl použit Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ a Image Lab™ Software.

Tab. 4.2. Složení PCR reakcí (množství v reakci (μl))

<i>Alela genu</i> /Složka PCR reakce	**Prdm9^{tm1Ymat}	**Piwil2^{tm1.1Doca}	*Mybl1^{repro9}	*Dicer^{del667}
Milli-Q® H ₂ O***	12,75	12,2	17,5	13,2
dNTP mix	0,44	0,5	0,5	0,5
primer	0,4	0,6	0,5	0,6
primer	0,4	0,6	0,5	0,6
primer	0,4	0,6	-	-
10x reakční Taq pufr pro Taq DNA polymerázu	2,1 (K)	2 (N)	2,5 (K)	2 (N)
MgCl ₂	1,26	2	2	1,6
Taq DNA polymeráza	0,25	0,5	0,3	0,5
templátová DNA	2	1	1,2	1
Celkový objem reakce (μl)	20	20	25	20

K: reakční Taq pufr s KCl bez MgCl₂; N: reakční Taq pufr s (NH₄)₂SO₄ bez MgCl₂

* k typizování jsou použity dva páry primerů ve dvou PCR reakcích – jeden primer nasedá jen na mutovanou alelu, druhý pár jen na wt alelu, třetí primer je kompatibilní s oběma těmito primery, ale oba dávají stejně dlouhý produkt; proto je potřeba typizace ve dvou PCR reakcích, oproti tomu – ** u alely genu *Prdm9* a *Piwil2* jsou produkty odlišně dlouhé, takže je možné mít všechny tři primery ve stejné PCR reakci

*** ultračistá H₂O – systém Merck Millipore Direct-Q® 3 UV Water Purification System

Tab. 4.3. Sekvence primerů

Název alely	Sekvence primerů	Teplota nasedání primerů	Produkty
<i>Prdm9^{tm1Ymat}</i>	(A) CGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTT (B) AGGAATCTTCCTTCCTTGCTGTCG (C) ATTTCCCTGTATCTTCTTCAGGACT	58°C	KO>wt wt: 319 bp KO: 450 bp primery A, B, C v jedné PCR reakci
<i>Piwil2^{tm1.1Doca}</i> (<i>Mili^{DAH}</i>)	(A) GATTGAACCTTGTGCCTCGTA (B) GCAGGTGTGCAACCAGATA (C) TGTAGCCCCATCATGCAAG	50°C	KO>wt wt: 331 bp (PWD alela) nebo 328 bp (B6 alela) KO: 373 bp (PWD alela) nebo 370 bp (B6 alela) primery A, B, C v jedné PCR reakci
<i>Mybl1^{repro9}</i>	(A) TTGCAAATGGTCCATAGCCG (B) TTGCAAATGGTCCATAGCCT (C) TTTGTGCTAAAATTTGTAGAATTCCTT	55°C	KO=wt cca 210 bp dvě PCR reakce wt alela: primery A + C KO alela: primery B + C
<i>Dicer1^{em3Psv}</i>	(A) GACCAGCTCCAGCCATGACCAG (B) ACAGCAGCCCCAAAATGTAACTCC (C) TGCCTTCAGGTTCTGACTTCCT	60°C	dvě PCR reakce primeryC + B – 382 bp/nic primeryA + B – 869 bp / 195 bp wt/wt – 869 bp + 382 bp wt/KO – 195 bp + 382 bp KO/KO – 195 bp

*wt – nemutovaná alela; KO – mutovaná alela

Tab. 4.4. Podmínky PCR reakce

Tab. 4. 4. A. Detekce alely *Mybl1^{repro9}*

krok	teplota (°C)	čas (min)	jdi na krok	počet cyklů
1	95,0	4:00		
2	95,0	0:30		
3	62,0*	0:25		
4	72,0	0:25	2	2
5	95,0	0:30		
6	55,0	0:25		
7	72,0	0:25	5	30
8	72,0	6:00		
9	4,0	∞		

*při každém dalším cyklu snížení teploty o 0,5°C

Tab. 4. 4. B. Detekce alely *Dicer1^{em3Psv}*

krok	teplota	čas	jdi na krok	počet cyklů
1	95,0	0:30		
2	95,0	0:30		
3	60,0	0:30		
4	72,0	1:30	2	32
5	72,0	3:00		
6	14,0	∞		

Tab. 4. 4. C. Detekce alely *Mili^{DAH}*

krok	teplota	čas	jdi na krok	počet cyklů
1	95,0	0:30		
2	95,0	0:30		
3	50,0	0:45		
4	72,0	1:30	2	38
5	72,0	3:00		
6	14,0	∞		

Tab. 4. 4. D. Detekce alely *Prdm9^{tm1Ymat}*

krok	teplota	čas	jdi na krok	počet cyklů
1	94,0	0:45		
2	94,0	0:30		
3	60,0	0:05		
4	68,0	0:30	2	2
5	94,0	0:30		
6	58,0	0:15		
7	68,0	0:40*	5	36
8	70,0	5:00		
9	8,0	∞		

* v každém dalším cyklu prodloužení doby extenze o 1s

4.2.2 Určování fenotypu

Autorka této práce je oprávněna k práci s laboratorními myšmi na základě Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb, na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Pitva myši

Myši byly uspány chloroformem a poté usmrceny cervikální dislokací. Myš byla zvážena. Z myši byly vyjmuty obě nadvarlata a obě varlata. Dále byl odebrán vzorek ocasní tkáně a případně slezina, kvůli případnému ověření genotypu. Kousek ocásku i slezina byly zvlášť umístěny do dvou 1,5ml mikrozkuvek a pak rychle zmrazeny v tekutém dusíku. Tyto vzorky byly dlouhodobě uchovávány v mrazáku při -20°C.

Obě varlata byla zvážena a jejich tunika byla propíchnuta jehlou na třech místech (aby mohl fixační roztok lépe vniknout do varlete). Poté byla vložena do 2ml mikrozkuvky s 2 ml roztoku Bouinu, kde byla fixována ve 4°C přes noc. Druhý den byl fixační roztok odstraněn a zafixované orgány byly dvakrát promyty roztokem 1xPBS, pak byly umístěny do 50% roztoku ethanolu, kde byly inkubovány po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly přemístěny do 70% ethanolu, kde mohly být uchovávány po dobu až 14 dnů, během nichž byly dále zpracovány (viz dále „Histologické preparáty“).

Obě nadvarlata byla umístěna do 1,5ml mikrozkuvky s 0,5 ml roztoku 1x PBS. Bylo ověřeno, že veškerá tkáň obou nadvarlat je pod hladinou roztoku.

Počet spermií a procento malformovaných hlaviček spermií

Obě nadvarlata v 1,5ml mikrozkuhavce v 1xPBS byla nůžkami rozstříhána tak, aby kousky tkáně nebyly delší než 2 mm (odpovídá asi 50-70 stříhnutím malými nůžkami). Vzorek byl pak protřepán, a po 5-10 sekundách bylo z mezifáze odebráno 10 μ l suspenze. Tato suspenze pak byla přemístěna do Bürkerovy komůrky, pomocí níž bylo stanoveno množství spermií ve vzorku.

V případě, že myš měla vysoký počet spermií (lze odhadnout podle váhy varlat), suspenze byla naředěna pomocí 1x PBS tak, aby bylo možné bez problému stanovit počet spermií (např. obvyklé ředění u varlat o váze 180 mg bylo 80x).

Spermie byly počítány při zvětšení 400x na světelném mikroskopu Leica DM1000 LED pod fázovým kontrastem a zeleným filtrem.

V případě, že u myši byly přítomné spermie, odečítalo se i procento malformovaných hlaviček spermií. Tento preparát byl připraven tak, že po rozstříhání nadvarlat bylo z mezifáze (po protřepání a 5-10 sekundách) odebráno 90 μ l suspenze do nové 1,5ml mikrozkuhavky. K ní pak bylo přidáno 10 μ l 1% roztoku eosinu, obsah mikrozkuhavky byl protřepán a inkubován při 20°C po dobu 35 minut.

Poté bylo, po opětovném protřepání a 5-10 sekundách, odebráno 15 μ l nabarvené suspenze, ze které byl vytvořen stěr na podložním sklu. Po úplném zaschnutí suspenze na mikroskopickém sklíčku byl preparát montován médiem Mowiol. Z takto připraveného stěru bylo odečteno nejméně 100 spermií, u kterých bylo rozlišeno, zda jsou jejich hlavičky malformované, či nikoliv (Obr. 4.1).

Histologické preparáty

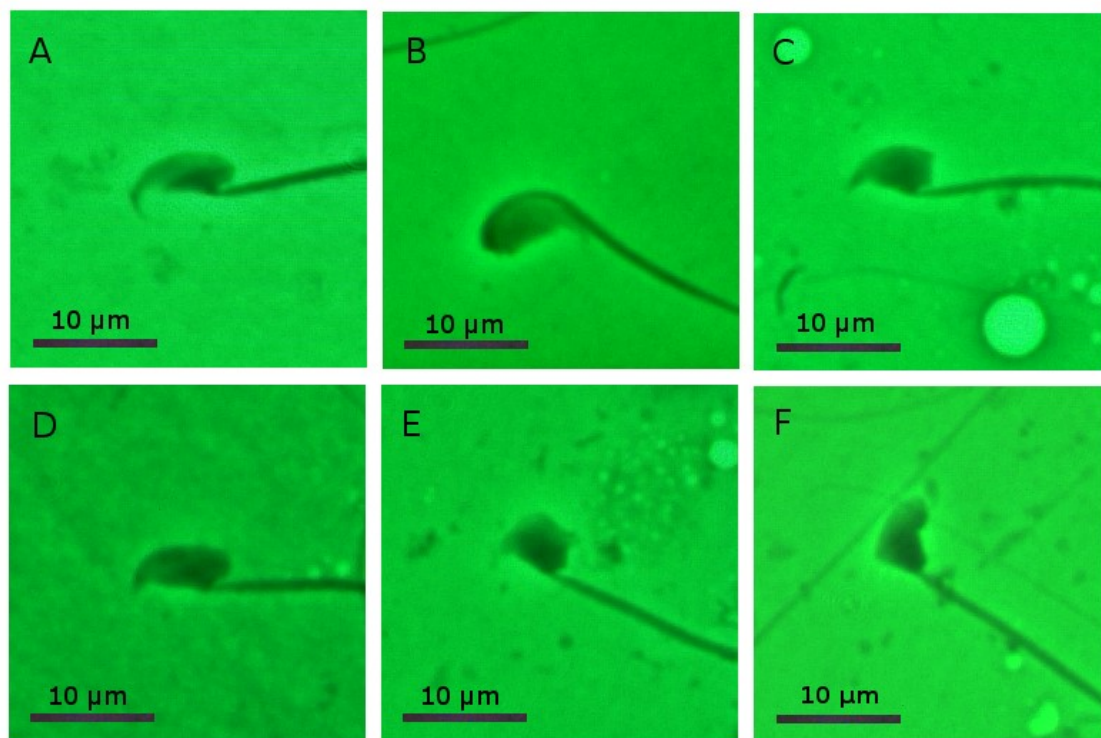
Vzorky testes byly ze 70% ethanolu přemístěny do přístroje Leica ASP200S. Tento přístroj během šestnáctihodinového cyklu tkáň dehydratuje a nasytí parafinem. Vzorky byly pak dále zality do parafinových bločků na zalévací stanici Leica EG1150H. Po zatuhnutí parafinu byly vzorky skladovány v +4°C.

Vzorky v parafinových bločcích byly dále nařezány na mikrotomu Leica RM2255 na tloušťku 3 μ m. Takto připravené preparáty na mikroskopickém sklíčku byly nabarveny pomocí haematoxylinu a eosinu (podle Tab. 4.5). Použitým montovacím médiem byl Solakryl BMX.

Z histologických preparátů tkáně varlat bylo stanoveno procento semenotvorných kanálků, obsahujících spermatogonie, spermatocyty a kulaté a elongované spermatidy

(Obr. 4.2). U každé myši bylo vyhodnoceno minimálně 90 semenotvorných kanálků ze 3 různých navzájem nesousedících řezů tkáně (30 tubulů z každého řezu).

Obr. 4. 1. Morfologie spermií

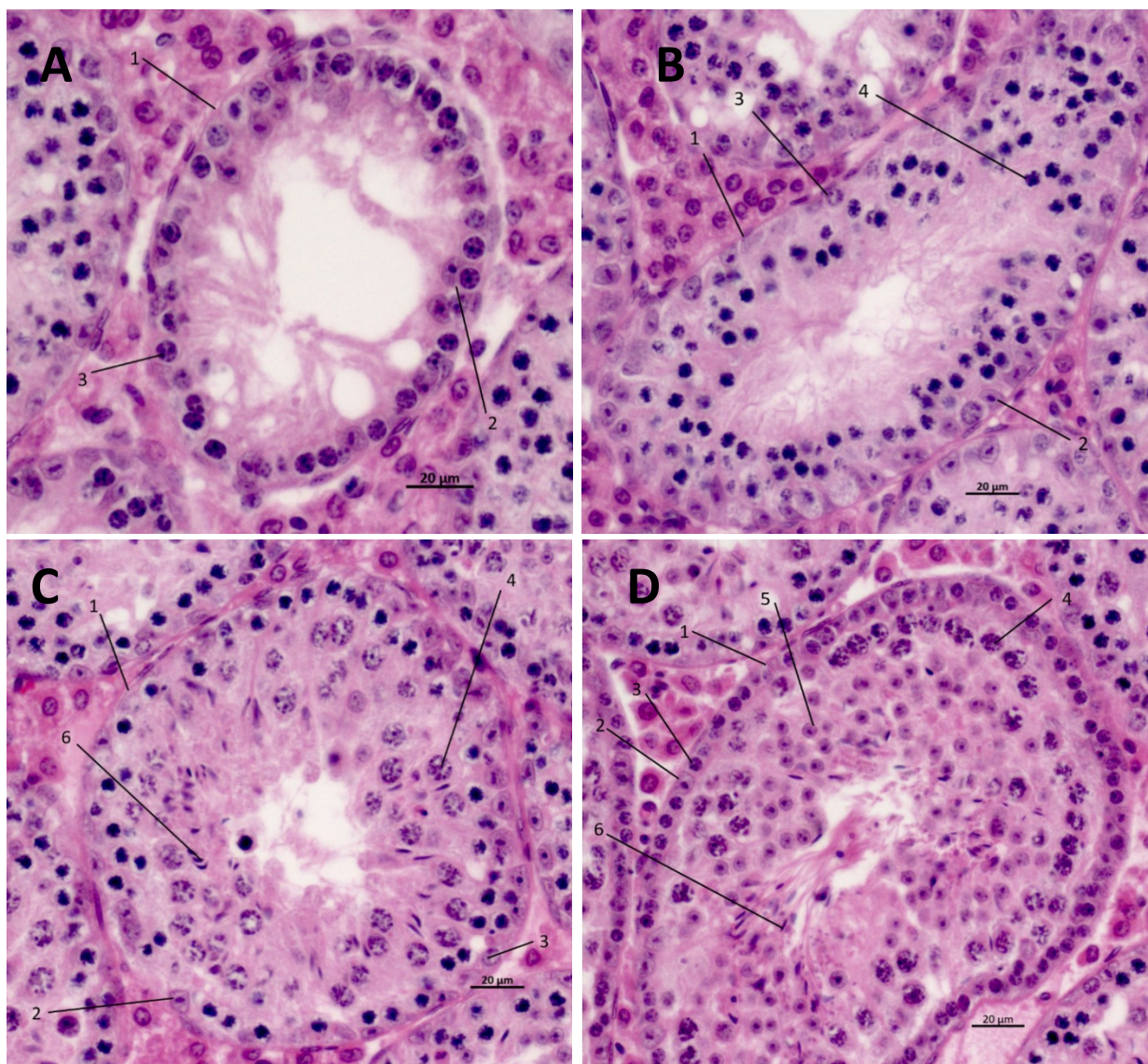


A – normální hlavička spermie; B-E – různé typy malformovaných spermií

Tab. 4. 5. Postup barvení histologických preparátů haematoxylinem a eosinem

Roztok	čas (minuty)
xylen	5
xylen	5
xylen	4
xylen + ethanol	5
100% ethanol	4
100% ethanol	4
95% ethanol	4
70% ethanol	4
destilovaná voda	2
haematoxylin	1
destilovaná voda	několikanásobný oplach po několik sekund
1% roztok eosinu	4
destilovaná voda	několik sekund
70% ethanol	4
95% ethanol	4
100% ethanol	4
100% ethanol	4
xylen + ethanol	4
xylen	4
xylen	4

Obr. 4. 2. Semenotvorné kanálky sterilních a fertálních samců obarvené hematoxylinem a eosinem



- 1 – bazální membrána
- 2 – Sertoliho buňka
- 3 – spermatogonie
- 4 – spermatocyt
- 5 – kulatá spermatida
- 6 – elongovaná spermatida

V tubulech (A-D) jsou přítomny tyto zárodečné buňky:

A – tubul s přítomnými spermatogoniemi

B – tubul s přítomnými spermatogoniemi a spermatocyty

C, D – v tubulech jsou přítomné spermatogonie, spermatocyty i kulaté a elongované spermatidy

Příprava jednobuněčné suspenze z testikulárních buněk

Pomocí nepřímého imunofluorescenčního barvení struktur synaptonemálního komplexu u testikulárních buněk byla posuzována kvalita synapse pachytenních spermatocytů.

Z obou vypitvaných varlat myši určených na jednobuněčnou suspenzi byla odstraněna tunika. Tkáň byla pinzetou jemně rozvolněna a umístěna do 50ml kónické polypropylenové centrifugační zkumavky s 10 ml (čerstvě připraveného) média EKRB.

Do zkumavky bylo ke vzorku přidáno 100 μ l kolagenázy ($c = 50 \text{ mg.ml}^{-1}$) a 50 μ l DNázy ($c = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$) a její obsah byl krátce rukou protřepnut. Poté byla zkumavka umístěna na třepáčku (Incubated Shaker IST-3075) a třepána 20 min. při 32°C, 120 rpm.

Následně byl vzorek 20-25x (podle stupně rozvolnění tkáně) intenzivně propipetován odstřiženou 1000 μ l špičkou. Poté byla suspenze přefiltrována přes filtr (Falcon™ Cell Strainers, 40 μ m, nylon), filtrát byl zlikvidován. Filtr se zbytky tkáně byl zespodu a ze stran obalen parafilmem (Bemis™ Parafilm M™ Laboratory Wrapping Film) a třikrát vypláchnut do nové 50ml polypropylenové centrifugační zkumavky tak, aby veškerá tkáň zachycená na filtru byla převedena do nové zkumavky. K vzorku bylo dále přidáno 100 μ l kolagenázy ($c = 50 \text{ mg.ml}^{-1}$) a 50 μ l DNázy ($c = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$) a byl protřepáván 22 min. při 32°C, 120 rpm.

Poté byl vzorek opět 20-30x propipetováván neodstřiženou 1000 μ l špičkou do vzniku slabě mléčného zákalu. Přes nový filtr byl vzorek přefiltrován do nové 50ml zkumavky, a k filtrátu bylo doplněno EKRB médium do objemu 15 ml. Vzorek byl dále centrifugován při 20°C, 180 g, 12 min (centrifuga Jouan BR4i).

Mezitím byla připravena mikroskopická podložní sklíčka do humidní komůrky do 4°C a namíchán roztok 1% paraformaldehydu. 65 μ l tohoto roztoku bylo nakapáno na každé sklíčko a ponecháno 10 min. temperovat.

Po skončení centrifugace byl supernatant odstraněn a pelet opatrně resuspendován v 10 ml nového média EKRB. Následovala druhá centrifugace při 180 g, 15 min, 20°C. Supernatant byl opět opatrně odlit a peleta byla resuspendována ve 300 μ l média EKRB. Z tohoto vzorku bylo odstřiženou špičkou odebráno 25 μ l, které byly opatrně vmíchány do 100 μ l 0,1 M roztoku sacharózy v 1,5ml mikrocentrifugační zkumavce. Vzorek byl v roztoku sacharózy inkubován 13 min. ve 20°C.

Po inkubaci bylo na nachystaná sklíčka s roztokem 1% paraformaldehydu z deseticentimetrové výšky nakapáno 35 μ l vzorku. Následovala fixace buněčných jader ve

4°C po dobu 3 hodin. Podložní sklíčka byla následně opláchnuta v Milli-Q® H₂O a sušena na vzduchu ve 20°C po dobu 5-10 min. Poté byla odmývána po dobu 10 min. v 1xPBS (upraveno podle Anderson et al., 1999).

Takto připravené preparáty lze skladovat po několik dní ve 4°C v 1x PBS, nebo je lze rovnou barvit protilátkami.

Nepřímé imunofluorescenční barvení preparátů

Podložní skla s preparáty byla vyjmuta z 1xPBS a otřena po stranách a ze spodní strany do buničité vaty. Kvůli omezení nespecifických interakcí protilátek bylo provedeno blokování pomocí 0,5xMAH – na každé sklo bylo nakapáno 100 µl tohoto roztoku a opatrně překryto krycím sklíčkem. Blokování probíhalo v humidní komůrce při 4°C po dobu 1 hodiny.

Po skončení blokování bylo krycí sklíčko opatrně shozeno, na sklo s preparátem bylo nakapáno 100 µl primárních protilátek ředěných v 0,5xMAH (protilátky, ředění a doba inkubace podle Tab. 4.6). Inkubace probíhala opět pod krycím sklíčkem, ve 4°C v humidní komůrce.

Poté byla (po shození krycího sklíčka) skla odmývána v 1x PBS třikrát po 10 min. Následující kroky byly provedeny tak, aby se na skla zbytečně nesvítilo.

Skla byla zespodu opět osušena a na každé sklo bylo nakapáno 100 µl naředěných sekundárních protilátek. Následovalo opět překrytí krycím sklíčkem a inkubace ve tmě.

Po skončení inkubace byla skla znovu odmývána v 1x PBS třikrát po 10 min.

V případě, že nebylo možné všechny primární protilátky aplikovat v jednom kroku, následovala zde opět aplikace dalších primárních a poté sekundárních protilátek, jak je popsáno výše. S tím rozdílem, že skla nebyla znovu blokována a celý proces musel probíhat tak, aby se na skla přímo nesvítilo.

Po aplikování všech protilátek a posledním odmytí v 1xPBS byla skla namočená do Milli-Q® H₂O a poté svisle postavena na širší hranu a ponechána ve tmě a 20°C oschnout (cca 15 min.).

Poté byly preparáty zamontovány cca 25 µl montovacího média obsahujícím DAPI ($C_{\text{DAPI}} = 1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$), které nespecificky barví DNA (Vectashield® Mounting Medium with DAPI).

Z každého preparátu bylo nasnímáno 60-100 jader pachytenních spermatocytů (mikroskop Zeiss Axio Imager Z2; kamera Zeiss AxioCam IC), u nichž bylo vyhodnoceno,

zda jsou všechny chromozomy v synapsi a XY tělísko správně formované. U každé myši byl stanoven procentuální podíl buněk, které vykazovaly defekty v synapsi.

Tab. 4. 6. Protilátky a jejich ředění

primární protilátky			sekundární protilátky		
protilátka	ředění	doba inkubace	protilátka	ředění	doba inkubace
mouse anti-SCP3	1:50	přes noc	goat anti-mouse 488	1:500	1 h
rabbit anti-HORMAD2	1:200	1 h	goat anti-rabbit 568	1:500	1 h
mouse anti-γH2AFX	1:5000	1 h	goat anti-mouse 647	1:500	1 h

4.3 Použité chemikálie a přístroje

Chemikálie a složení roztoků

Tab. 4.3.1. Chemikálie

Název	Výrobce
32 % roztok paraformaldehydu	Electron Microscopy Sciences
Agaróza	Serva
Bouin roztok	Penta
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich
D-glukóza	Sigma-Aldrich
DNáza I	Affymetrix
EDTA (Kyselina ethylendiamintetraoctová)	Penta
Eosin Y	Lachema
Ethanol	Penta
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
Glycerol	Lach-Ner
Goat serum	Sigma-Aldrich
Haematoxylin Harris	Penta
HEPES	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný	Penta
Kolagenáza	Sigma-Aldrich
Kyselina boritá	Lach-Ner
Laktát sodný	Sigma-Aldrich
MEM směs esenciálních aminokyselin (50x)	Gibco Life Technologies
MEM směs neesenciálních aminokyselin (100x)	Gibco Life Technologies
Midori Green Advance	NIPPON Genetics
Mowiol (polyvinylalkohol)	Harco
Orange G	Sigma-Aldrich
Proteázové inhibitory – cOmplete [™] , Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Pyruvát sodný	Sigma-Aldrich
Roztok - L-Glutamin + penicilin + streptomycin	Sigma-Aldrich
Solakryl BMX	Lučební závody Draslovka
Tris báze (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth

Tab. 4.3.2. Roztoky

Roztok	Složení
1xPBS (Phosphate Buffered Saline) Výrobce: Média – Servisní pracoviště ÚMG	136,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
0,5xTBE	44,5 mM H ₃ BO ₃ 44,5 mM Tris 1 mM EDTA
nanášecí barvička s Orange G	8 mM Orange G 25% (v/v) glycerol
0,5 M EDTA	0,5 M EDTA pH = 8,0
1 M Tris-HCl	1 M Tris-HCl pH = 8,0
50 mM NaOH	50 mM NaOH
1% roztok eosinu	1% eosin Y (w/v)
1% roztok paraformaldehydu s inhibitory proteáz	1% paraformaldehyd 0,15% Triton X-100 pH = 9,2
0,1 M roztok sacharózy s inhibitory proteáz	0,1 M sacharóza 0,2x proteázové inhibitory
0,5xMAH – Binding Buffer	1,5% BSA 5% goat serum 0.05% Triton X-100 v 1xPBS 0,2x proteázové inhibitory
10x KRB	4,9 mM MgCl ₂ .6H ₂ O 45,6 mM KCl 1,2 M NaCl 7,04 mM Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 15 mM NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O 0,1 M D-glukóza
EKRB médium	1xKRB 1,27 mM CaCl ₂ 2 mM antibiotika s L-glutaminem 1x směs neesenciálních aminokyselin 1x směs esenciálních aminokyselin 12 mM NaHCO ₃ 4,44 mM laktát sodný 20 mM HEPES 6,5 mM pyruvát sodný

Tab. 4. 3. 3. PCR chemikálie

Roztok	Složení	Výrobce
Taq DNA polymeráza	5 U/μl rekombinantní Taq DNA polymeráza	Thermo Scientific
10x reakční pufr s (NH₄)₂SO₄ pro Taq DNA polymerázu	750 mM Tris-HCl (pH 8.8 při 25°C) 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1% (v/v) Tween 20	Thermo Scientific
10x reakční pufr s KCl pro Taq DNA polymerázu	100 mM Tris-HCl (pH 8.8 při 25°C) 500 mM KCl 0.8% (v/v) Nonidet P40	Thermo Scientific
MgCl₂	25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific
dNTP mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP	Thermo Scientific

Tab. 4. 3. 4. Protilátky

Protilátka*	Klonalita a organismus	Výrobce
mouse anti-SCP3	myší monoklonální (sc-74569)	Santa Cruz Biotechnology
mouse anti-H2AFX	myší monoklonální (clone JBW301)	Merck Millipore
rabbit anti-HORMAD2	králičí polyklonální (sc-82192)	Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	králičí polyklonální (A-11008)	Invitrogen
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L)	myší polyklonální (A-A11019)	Invitrogen
Alexa Fluor® 647 goat anti-mouse IgG (H+L)	myší polyklonální (A-21235)	Invitrogen

*ředění protilátek a doba inkubace viz výše

4. 3. 2. Software

Bio-Rad Image Lab™ Software

Gimp 2.8.10

Microsoft Office

Libre Office 5.1.4.2

PyRAT – Python Based Relational Animal Tracking <https://pyrat.img.cas.cz/>

ZEISS ZEN Digital Imaging for Light Microscopy

4. 3. 3. Přístroje

Binder Model ED 23

Merck Millipore Direct-Q® 3 UV Water Purification System

Leica DM1000 LED

Eppendorf Centrifuge 5424 R

Amersham Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 301

Biometra TProfessional Standard 96 Gradient

Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+

Bio-Rad Sub-Cell® Model 96 Cell

centrifuga Jouan BR4

Jeio Tech Incubated Shaker IST-3075

Zeiss Axio Imager Z2

Zeiss Axiocam IC

5 Výsledky

V následujícím textu budou používány tyto termíny: „Jednoduchý heterozygot“ znamená myš s mutací v heterozygotním stavu pouze v jednom genu; „dvojitý (složený) heterozygot“ je myš heterozygotní pro mutace ve dvou genech; jako „dvojitý homozygot“ bude označována myš s mutacemi ve dvou genech, u obou genů v homozygotním stavu.

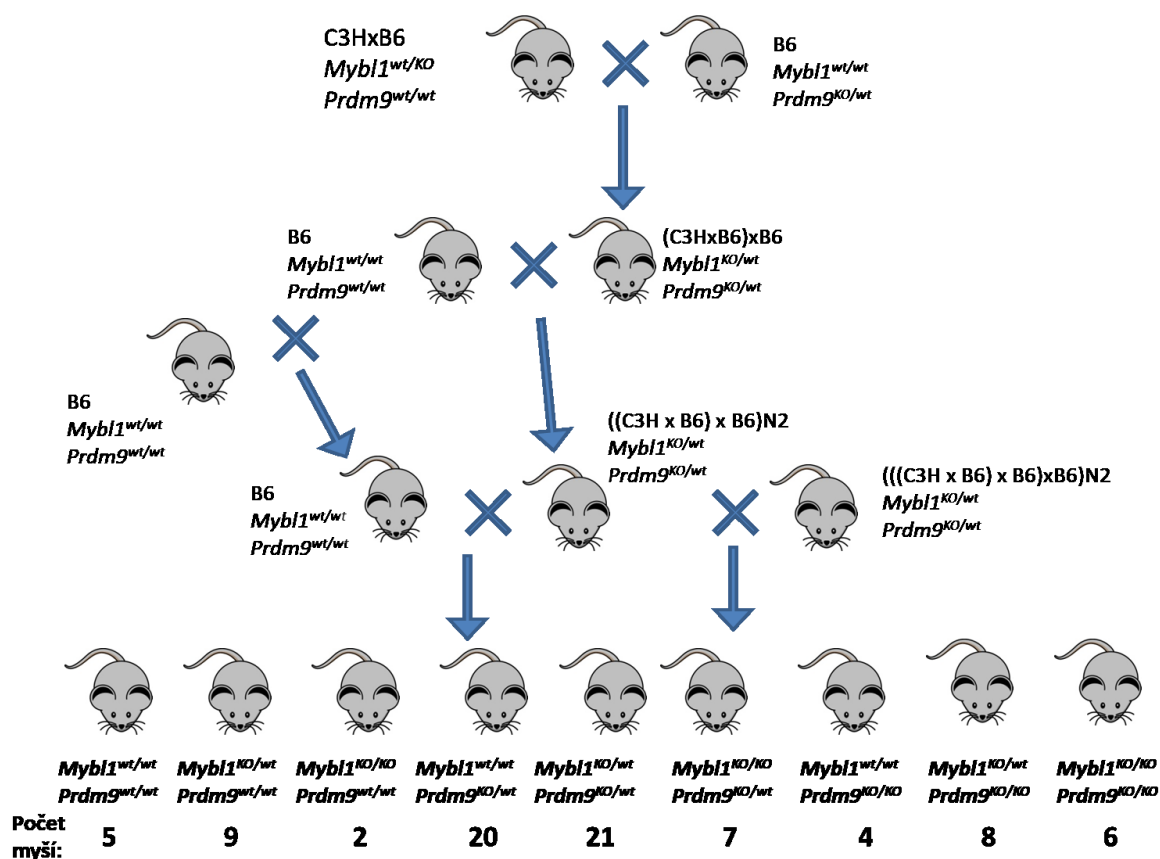
Kontrolami pro dvojité heterozygoty byly myši bez mutace dohromady s jednoduchými heterozygoty. Dvojití homozygoti byli porovnáváni s myšmi nesoucími mutace v genech v homozygotním stavu.

5.1 Interakce *Prdm9* a *Mybl1*

5.1.1 Fenotyp složených heterozygotů pro mutace *Prdm9^{tm1Ymat}* a *Mybl1^{repro9}*

Myši nesoucí mutaci *Mybl1^{repro9}*, které jsme měli k dispozici, byly na smíšeném C3HxB6 genetickém pozadí. Tyto myši byly kříženy s myšmi nesoucími mutaci *Prdm9^{tm1Ymat}* na B6 pozadí.

Obr. 5.1. Schéma křížení myší nesoucích mutantní alelu *Mybl1^{repro9}* s myšmi nesoucí mutaci *Prdm9^{tm1Ymat}* na B6 pozadí



Vzhledem k tomu, že v prvních filiálních generacích vykazovaly fertilitní parametry velkou variabilitu, rozhodli jsme se tyto myši opakovaně křížit kmenem s B6 pozadím, abychom docílili co nejvyššího podílu B6 sekvence v genomu. Udělali jsme několik statistických analýz, které měly podobné výsledky. Do konečného vyhodnocení byly zahrnuty myši, které byly zpětně kříženy na B6 pozadí dvakrát (N2) až osmkrát (N8). Křížení probíhalo podle schématu (Obr. 5.1).

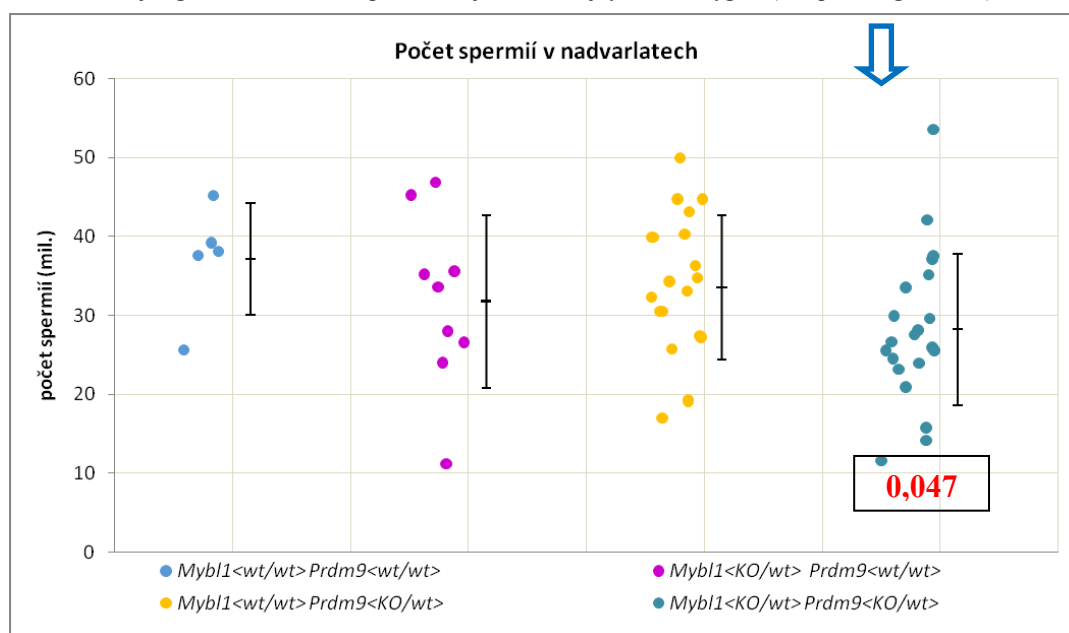
Myši z výše popsaného křížení z generací N2-N8 všech variant genotypů byly životaschopné, bez vnějších morfologických defektů. Celkem jsme analyzovali fertilitní parametry u 82 myší (Obr. 5.1).

Samci nesoucí mutaci v genu *Mybl1* v homozygotním stavu a/nebo deficientní pro *Prdm9* neměli spermie v nadvarlatech; proto jsme je analyzovali odděleně od ostatních.

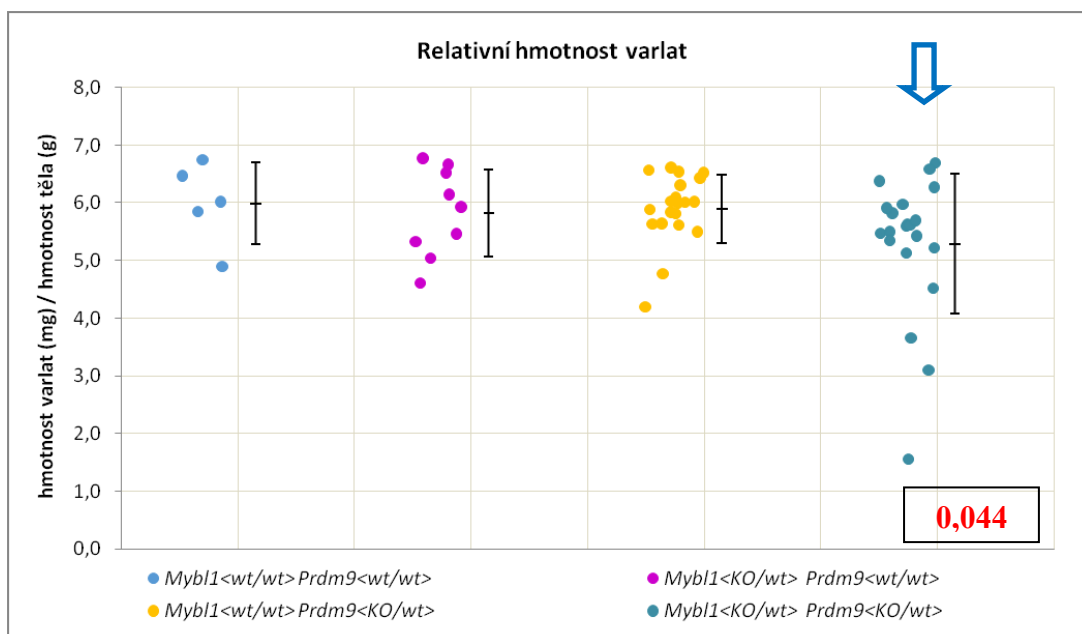
Složené heterozygoty jsme porovnávali s kontrolami (myšmi bez mutace a jednoduchými heterozygoty). Myši dvojité heterozygotní se v hmotnosti těla od kontrol nelišily ($p = 0,461$); ve srovnání s kontrolami měly redukovaný počet spermií v nadvarlatech (o 16%; $p = 0,047$; Graf. 5. 1; modrá šipka), sníženou relativní hmotnost varlat (o 10%; $p = 0,044$; Graf 5.2; modrá šipka) a zvýšený podíl malformovaných spermií (o 33%; $p = 0,01$; Graf 5.3; modrá šipka). Přítomnost spermií byla potvrzena i histologickou analýzou dvou samců, kdy v tubulech byly pozorovány spermie.

Graf 5. 1. Počet spermií v nadvarlatech

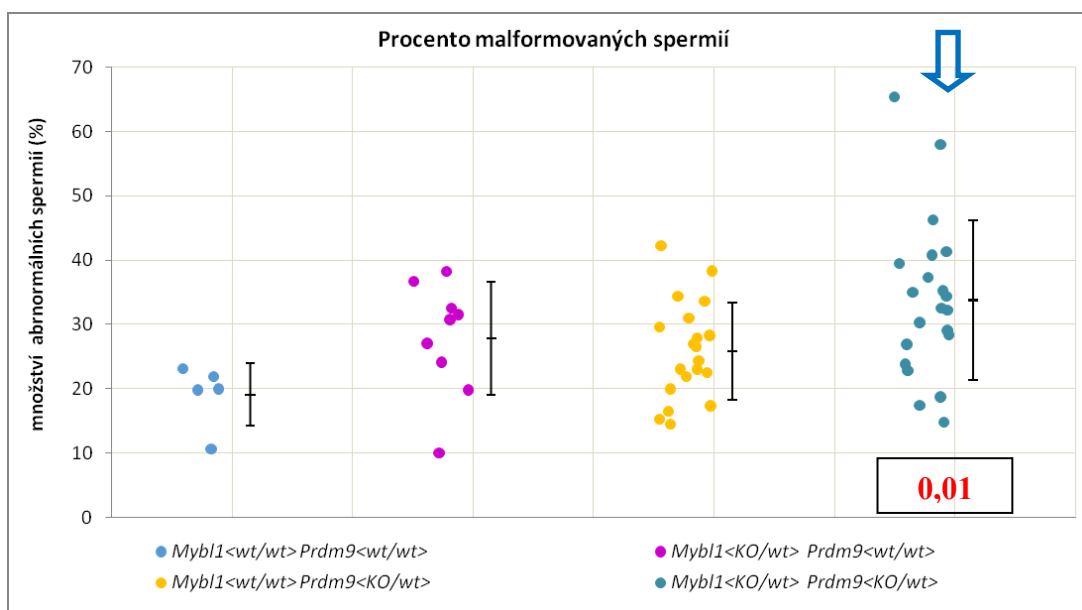
Graf ukazuje počet spermií u samců u jednotlivých genotypů; jsou zahrnuti pouze samci, u kterých byly spermie přítomné. Jedna tečka reprezentuje jednu myš, úsečky značí průměry a směrodatné odchylky, číslo v rámečku značí p hodnotu, pokud je červená, rozdíl je signifikantní. Modrá šipka označuje data z dvojité heterozygoty (toto platí i u grafů dále).



Graf 5. 2. Relativní hmotnost varlat (miligram hmotnosti varlat vztažený na gram hmotnosti těla) – zahrnutí pouze samci se spermiemi v nadvarlatech



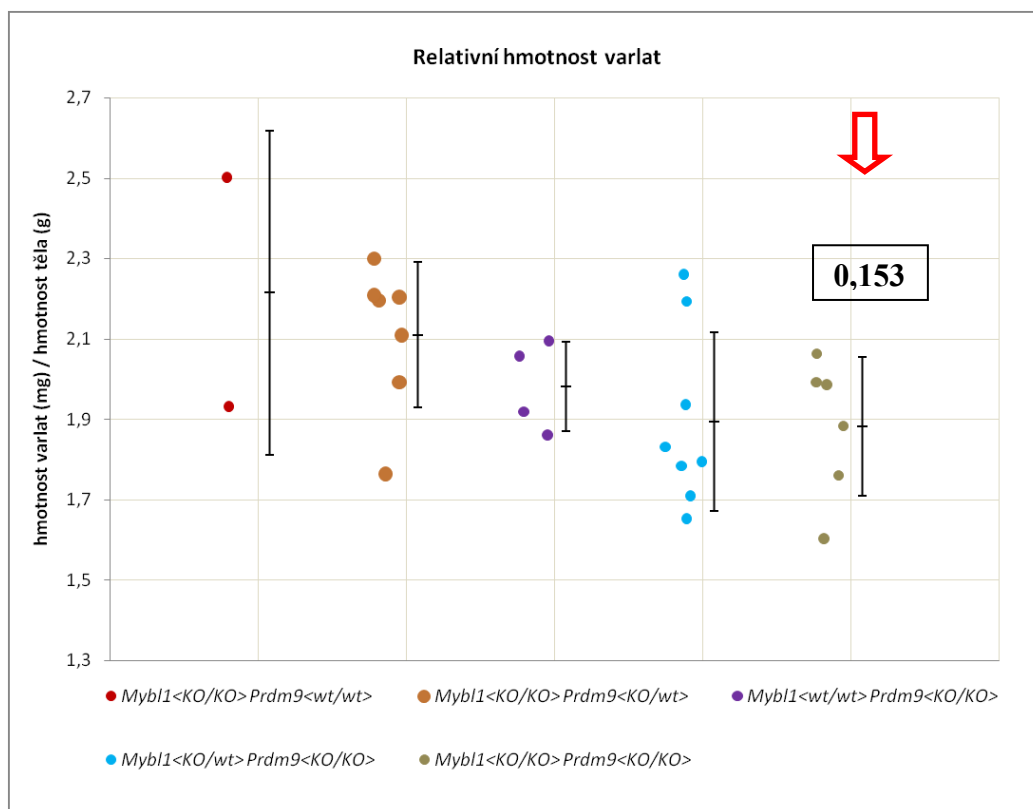
Graf. 5.3. Procento abnormálních spermií – zahrnutí pouze samci s přítomnými spermiemi



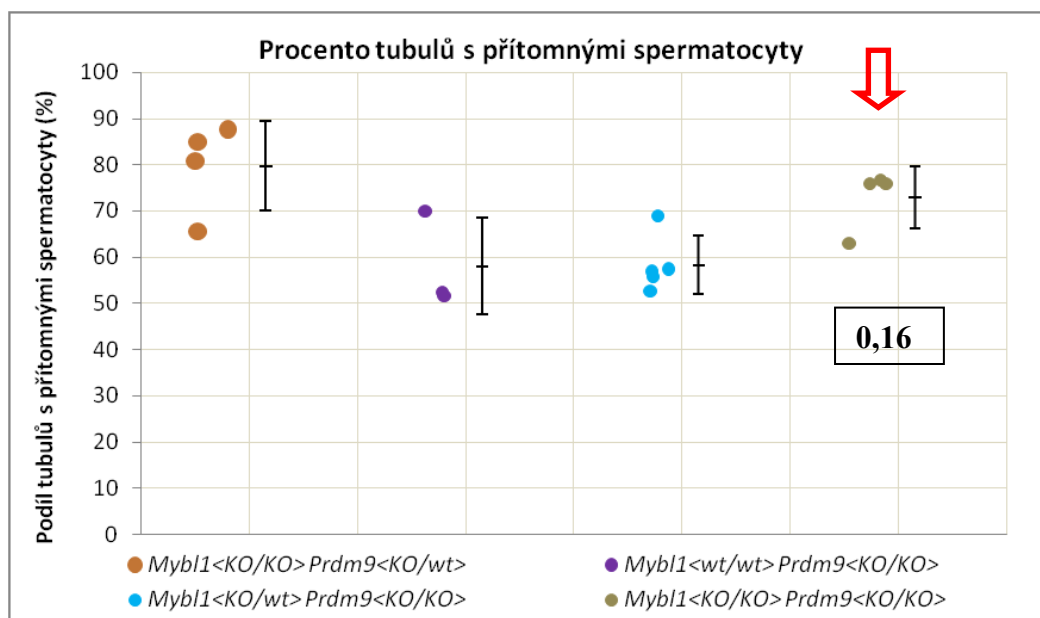
Myši homozygotní pro obě mutantní alely neměly ve srovnání s kontrolami (ostatními samci bez spermií) rozdílnou hmotnost těla ($p = 0,157$) ani relativní hmotnost varlat ($p = 0,153$; Graf 5.4; červená šipka). U žádné z myši deficientních pro *Mybl1* nebo *Prdm9* nebyly detekovány spermie. U 18 myši nesoucích mutace v homozygotním stavu jsem stanovila i podíl tubulů obsahujících spermatocyty; ve zbylých tubulech byly přítomny ze zárodečných buněk pouze spermatogonie. Dvojité homozygoti neměli rozdílný podíl tubulů obsahujících spermatocyty ve srovnání s kontrolami ($p = 0,161$; Graf 5.5; červená šipka).

Graf 5. 4. Relativní hmotnost varlat – jsou zahrnuti pouze samci, kteří nenesli spermie

Červená šipka označuje data z dvojitých homozygotů (platí i u grafů dále).

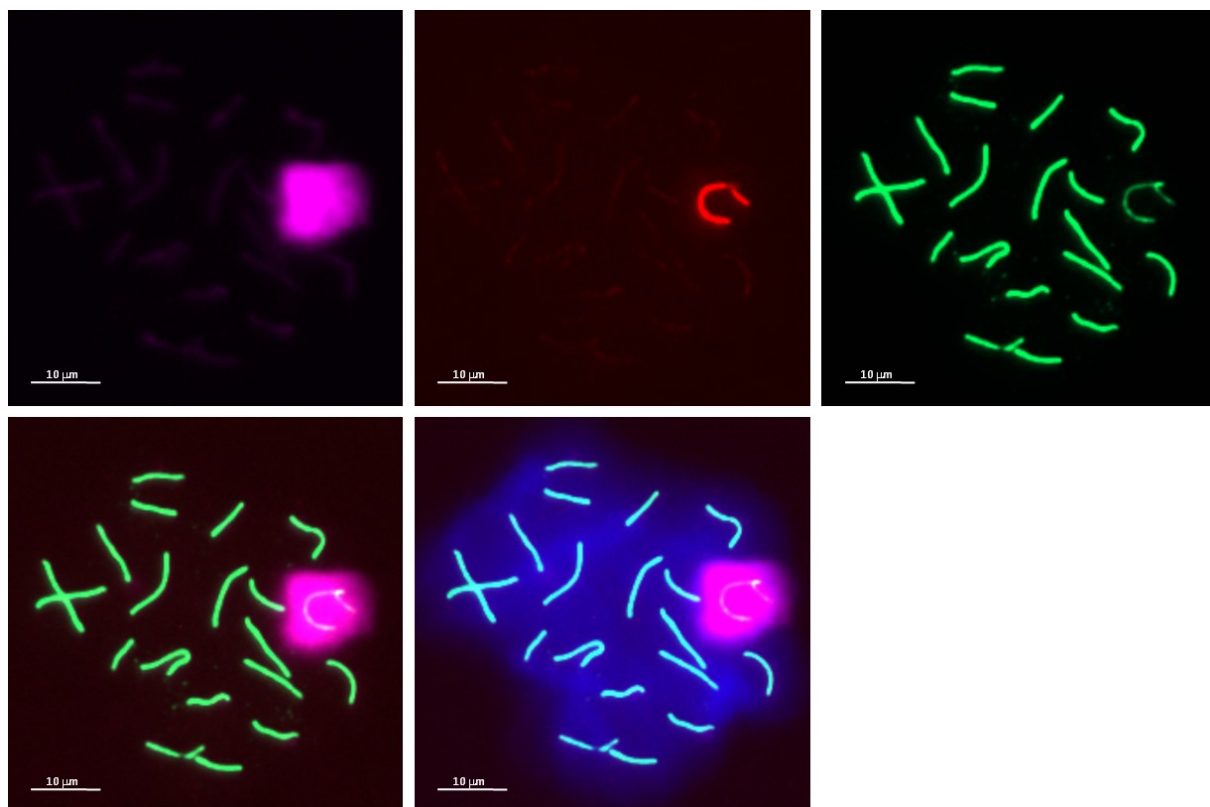


Graf. 5. 5. Podíl semenotvorných kanálků (tubulů) s přítomnými spermatocyty u myší, které nenesly spermie

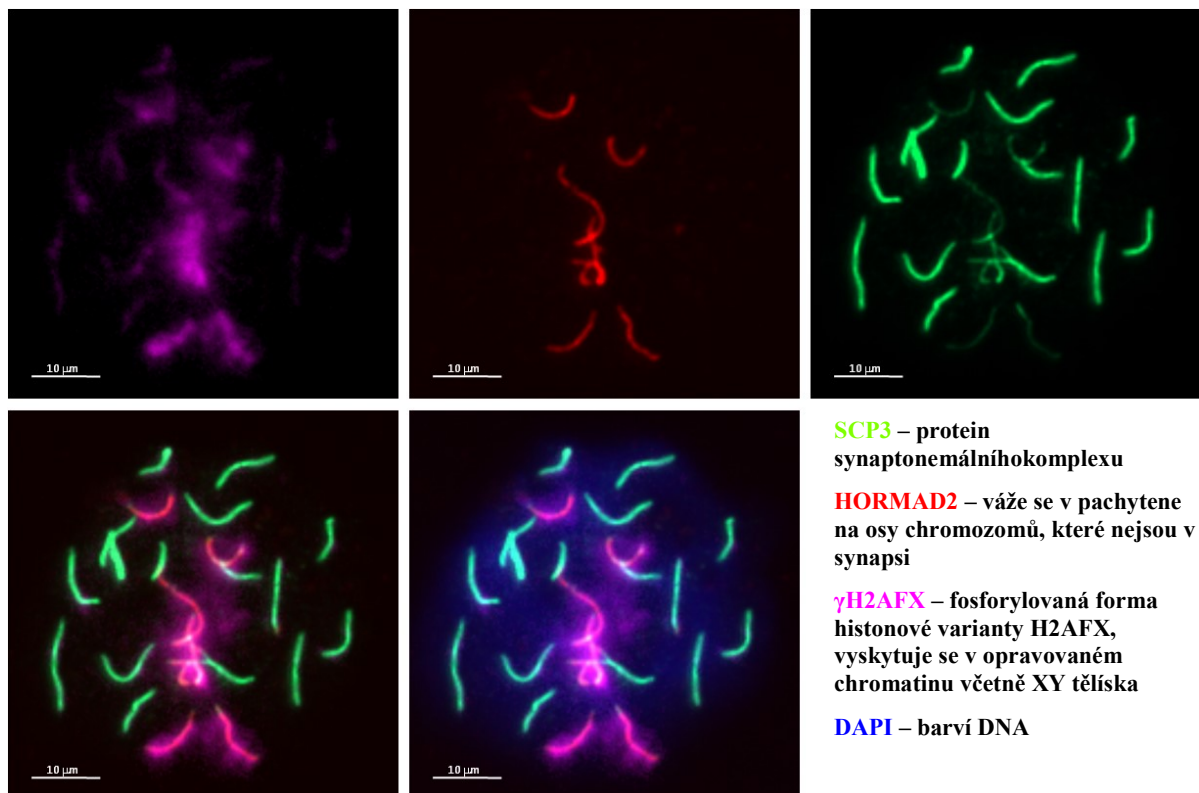


Obr. 5.2. Chromozomypachytenníchspermatocytů – příkladnormální synapse (A) a asynapse (B)

A. Synapse



B. Asynapse



SCP3 – protein synaptonemálního komplexu
HORMAD2 – váže se v pachytene na osy chromozomů, které nejsou v synapsi
γH2AFX – fosforylovaná forma histonové varianty H2AFX, vyskytuje se v opraveném chromatinu včetně XY tělíska
DAPI – barví DNA

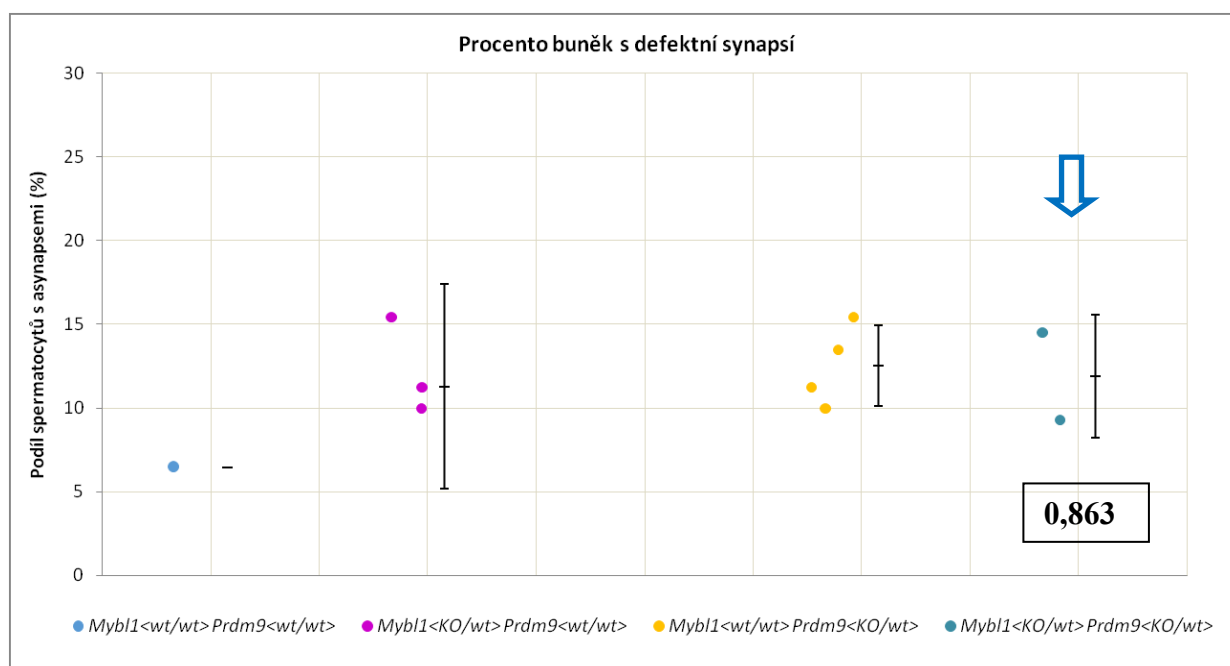
U tohoto křížení jsme hodnotili i kvalitu synapse u pachytenních spermatocytů, které byly barveny pomocí nepřímé imunofluorescence. Vzhledem k tomu, že analyzovaných myší bylo v tomto případě poměrně málo, nelze všechna tato data přímo statisticky vyhodnotit. Přesto lze z výsledků (Graf 5. 6. A, Graf 5. 6. B) vyvodit předběžné závěry. U každého z 15 analyzovaných samců bylo nafoceno a vyhodnoceno 60-100 buněk. Příklady pachytenních spermatocytů s kompletní synapsí a s defektní asynapsí jsou na Obr.5.2.

Myš s B6 pozadím bez mutací měla 6% spermatocytů s asynapsemi. Myši nesoucí mutaci v *Mybl1* v heterozygotním stavu nesly $11 \pm 6\%$ asynapsovaných spermatocytů. U myší heterozygotních pro mutaci v *Prdm9* jsme detekovali $12 \pm 2\%$ buněk s asynapsemi. Dvojití složení heterozygoti pro obě mutace měli $12 \pm 4\%$ defektních spermatocytů, což není odlišné od kontrol ($p = 0,863$; Graf 5. 6. A; modrá šipka).

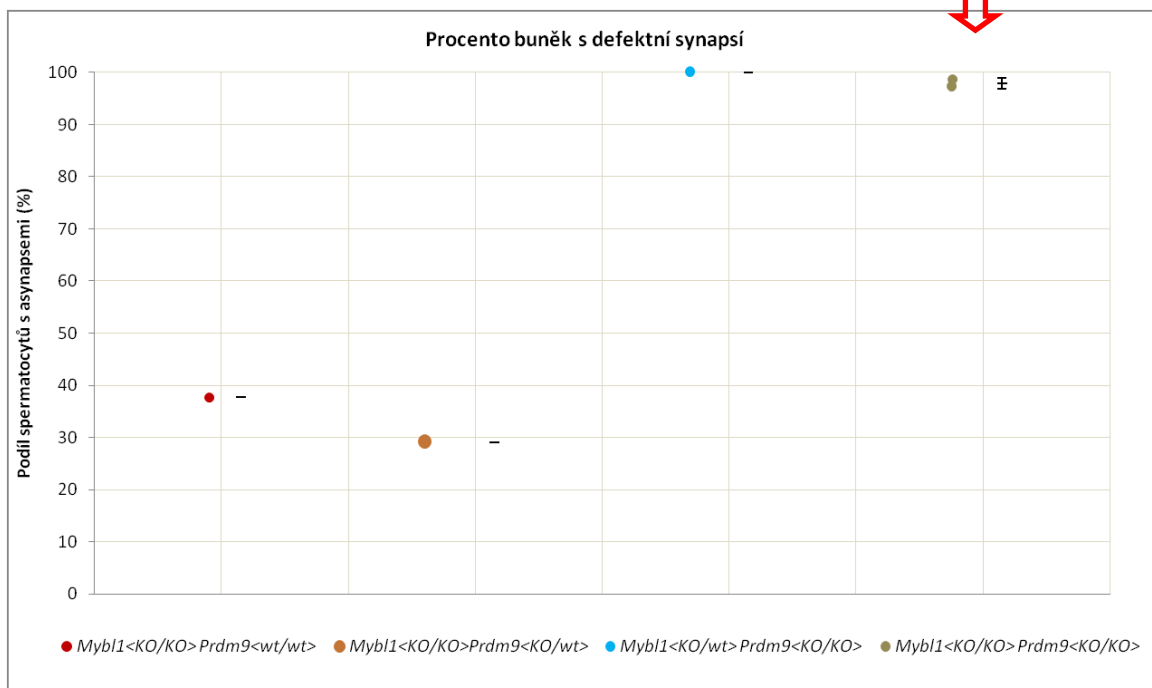
Myši homozygotní pro mutaci *Mybl1*^{repro9} měly 38% buněk s defekty v synapsi. Myši deficientní pouze pro *Prdm9* sice v této práci analyzovány nebyly, ale z jiných našich pokusů víme, že samci nesoucí nulovou alelu *Prdm9* na B6 pozadí vykazují 98-100% spermatocytů s asynapsemi (Flachs, Mihola, Trachtulec, nepublikováno).

Samec, který kromě deficeince pro *Prdm9* nesl mutaci v *Mybl1* v heterozygotním stavu měl 100% buněk v asynapsi. Myši homozygotní pro mutaci v *Mybl1* a zároveň v heterozygotním stavu pro mutaci v *Prdm9* měly 30% spermatocytů v asynapsi. Myši dvojitě homozygotní pro obě mutace měly téměř všechny buňky asynapsované ($98 \pm 1\%$), takže opět nevidíme žádný meiotický efekt (Graf 5. 6. B; červená šipka).

Graf 5.6. A. Podíl spermatocytů s defektní synapsí u samců se spermiemi



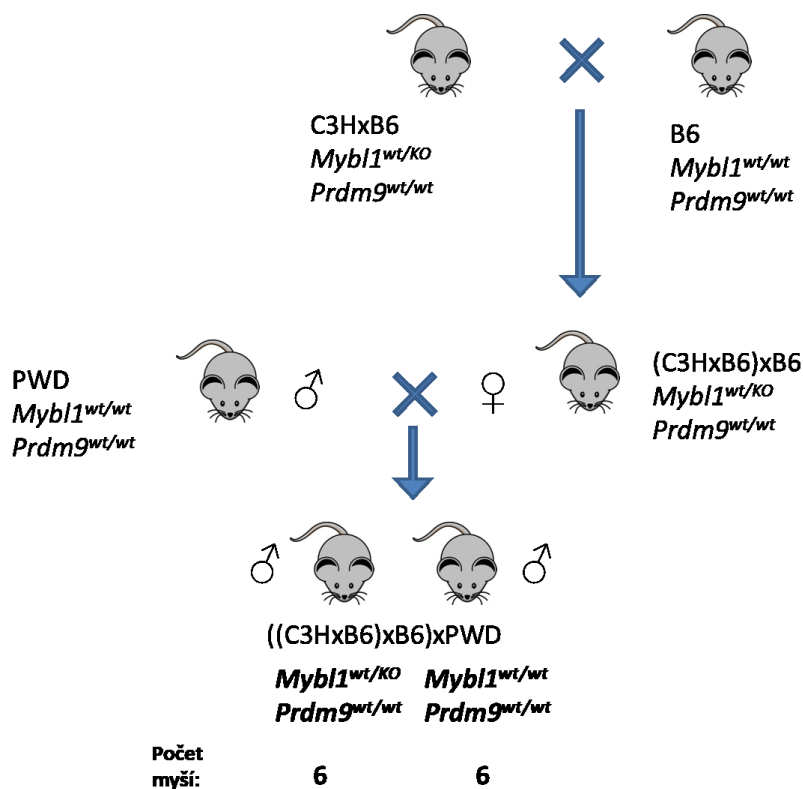
Graf 5. 6. B. Procento buněk s defektní synapsí – samci bez spermii



5.1.2 Mutace *Mybl1*^{repro9} ovlivňuje fertilitu mezipoddrhových hybridů

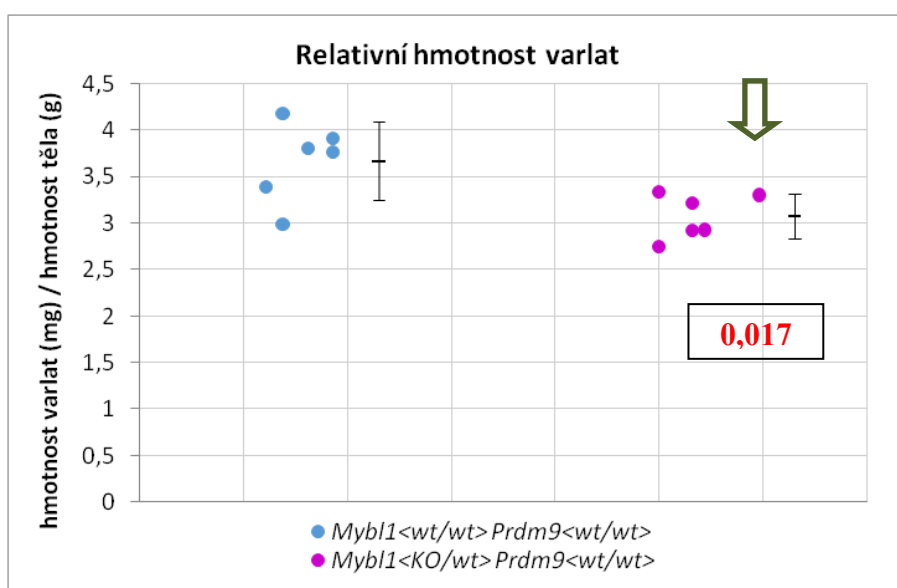
Nakřížili jsme myši nesoucí mutaci *Mybl1*^{repro9} a myši bez mutací s B6 pozadím; myši samičky narozené z tohoto křížení pak se samci s PWD pozadím. Vzniklí F1 hybridi byli analyzováni (Obr. 5.3.).

Obr. 5.3. Schéma křížení

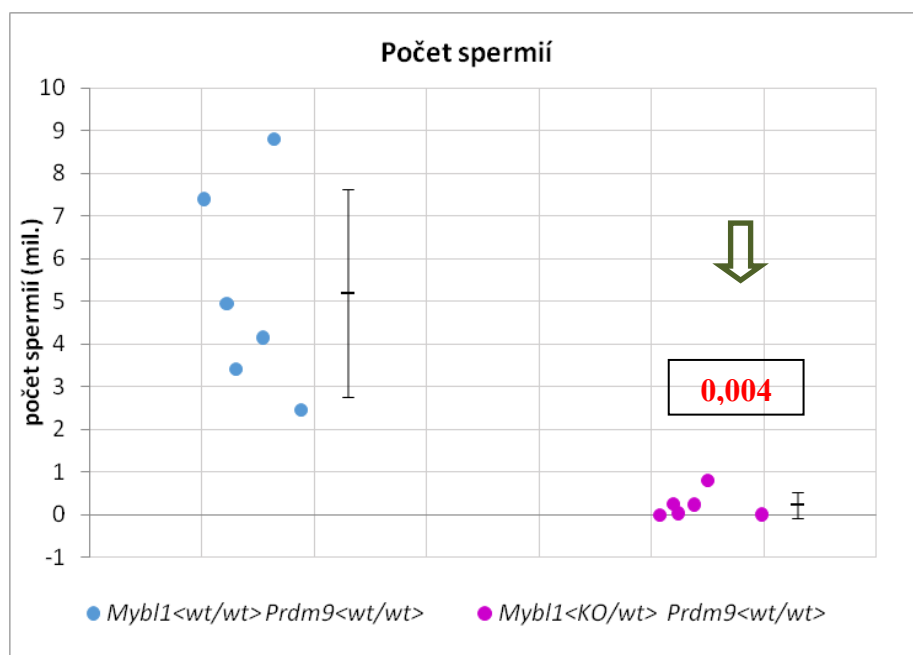


Celkem byly stanoveny fertilitní parametry u 12 myší. V tomto křížení jsme porovnávali pouze samce nesoucí mutaci v *Mybl1* v heterozygotním stavu s kontrolami. Myši s mutací *Mybl1^{repro9}* na mezipoddrohovém F1 pozadí neměly v porovnání s kontrolami (*Prdm9^{wt/wt}Mybl1^{wt/wt}*) změněnou hmotnost těla ($p = 0,700$). Naopak měly redukovanou relativní hmotnost varlat (o 16%; $p = 0,017$; Graf. 5.7; zelená šipka); redukovaný počet spermií v nadvarlatech (asi 25-krát; $p = 0,004$; Graf. 5.8); a zvýšené procento abnormálních spermií (o 17%; $p = 0,001$; Graf. 5.9).

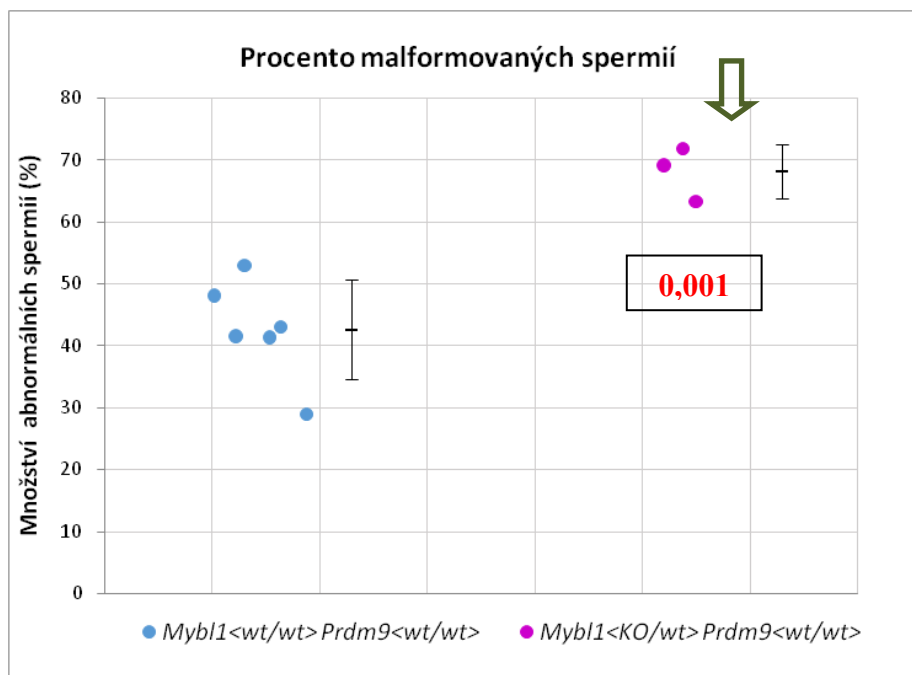
Graf 5.7. Relativní hmotnost varlat u samců nesoucích (zelená šipka; platí i u grafů dále) a nenesoucích mutantní alelu *Mybl1*.



Graf. 5.8. Počet spermií v nadvarlatech u myší nesoucích a nenesoucích mutantní alelu *Mybl1*



Graf 5.9. Procento abnormálních spermií u samců nesoucích a nenesoucích mutantní alelu *Mybl1*



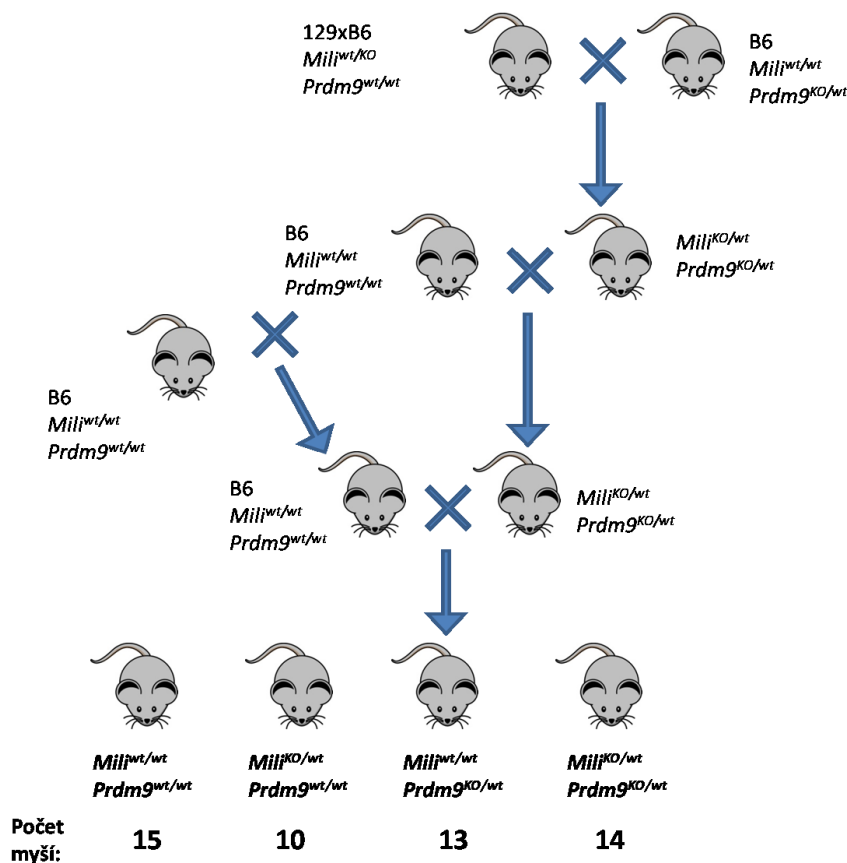
* u jednoduchých heterozygotů pro mutaci *Mybl1^{repro9}* bylo procento malformovaných spermií určeno pouze u tří myší, protože u preparátů zbylých tří myší nebylo dostatečné množství buněk na podložním sklíčku (méně než 100)

5.2 Interakce *Prdm9* a *Mili* (*Piwil2*)

5.2.1 Fenotyp složených heterozygotů pro mutace *Prdm9*^{tm1Ymat} a *Mili*^{DAH}

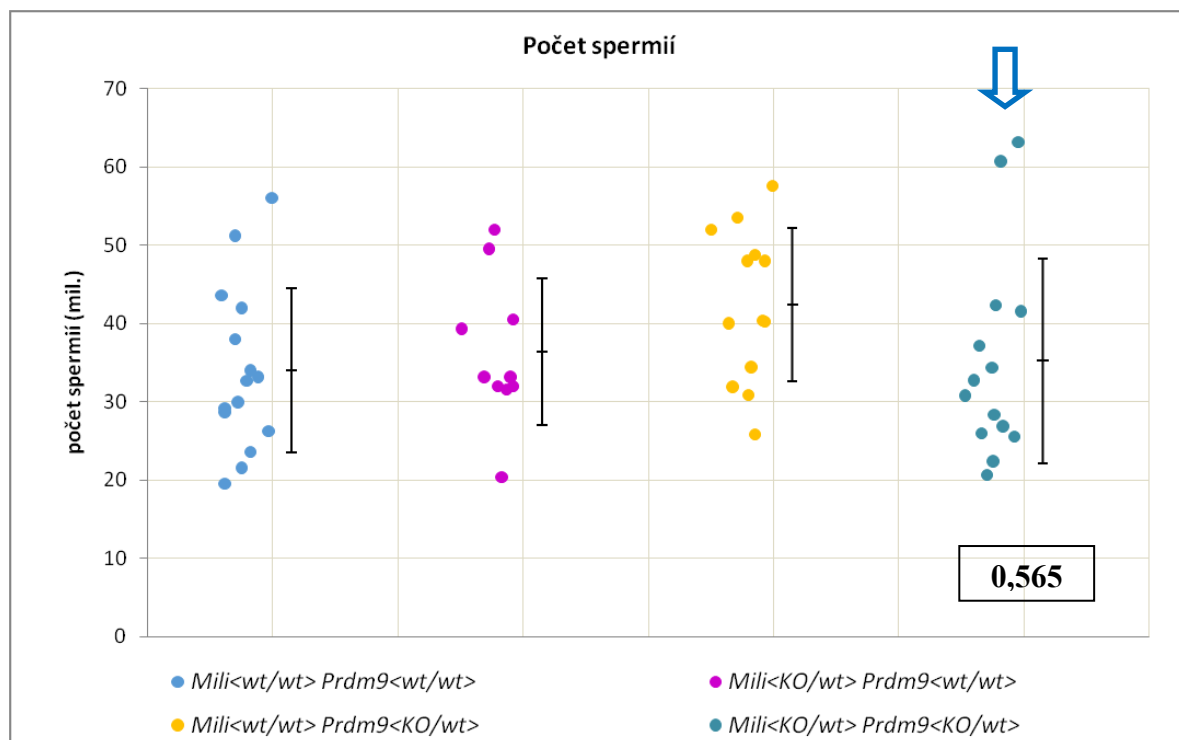
Myši nesoucí mutantní alelu *Mili*^{DAH} byly původně udržovány na smíšeném 129 a B6 genetickém pozadí, které není přesně geneticky definované. Tyto myši jsme křížili s heterozygoty pro mutaci *Prdm9*^{tm1Ymat} na B6 pozadí. Protože fertilitní parametry vykazovaly opět velkou variabilitu, použili jsme stejnou strategii jako při křížení s mutací *Mybl1*^{repro9} (viz výše) a tyto myši jsme opakovaně křížili na B6 pozadí (Obr. 5.4). Ve vyhodnocení byly použity myši křížené dvakrát (N2) až pětkrát (N5). Celkem bylo analyzováno 52 myší.

Obr. 5.4. Schéma křížení

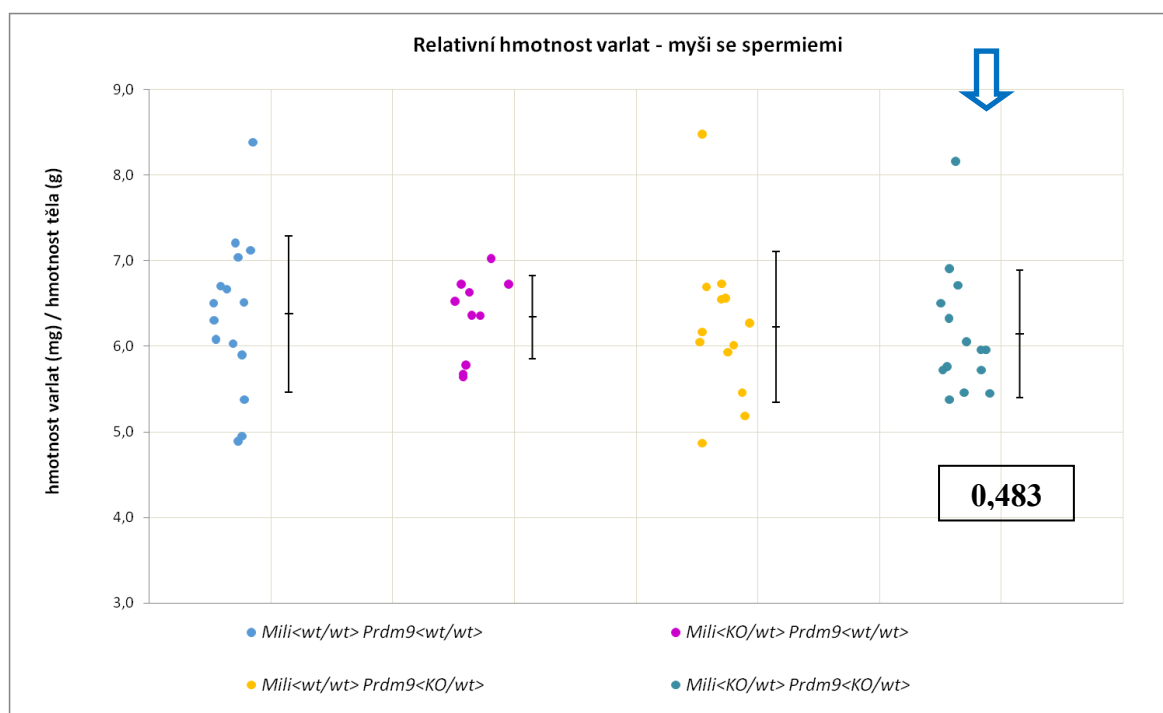


Složení heterozygoti se nelišili od kontrol v hmotnosti těla ($p = 0,299$), počtu spermií ($p = 0,565$; Graf 5.10; modrá šipka), ani v relativní hmotnosti varlat ($p = 0,483$; Graf 5.11; modrá šipka), ale vykazovali zvýšené množství abnormálních spermií (zhruba o 53%; $p = 0,002$; Graf 5.13; modrá šipka).

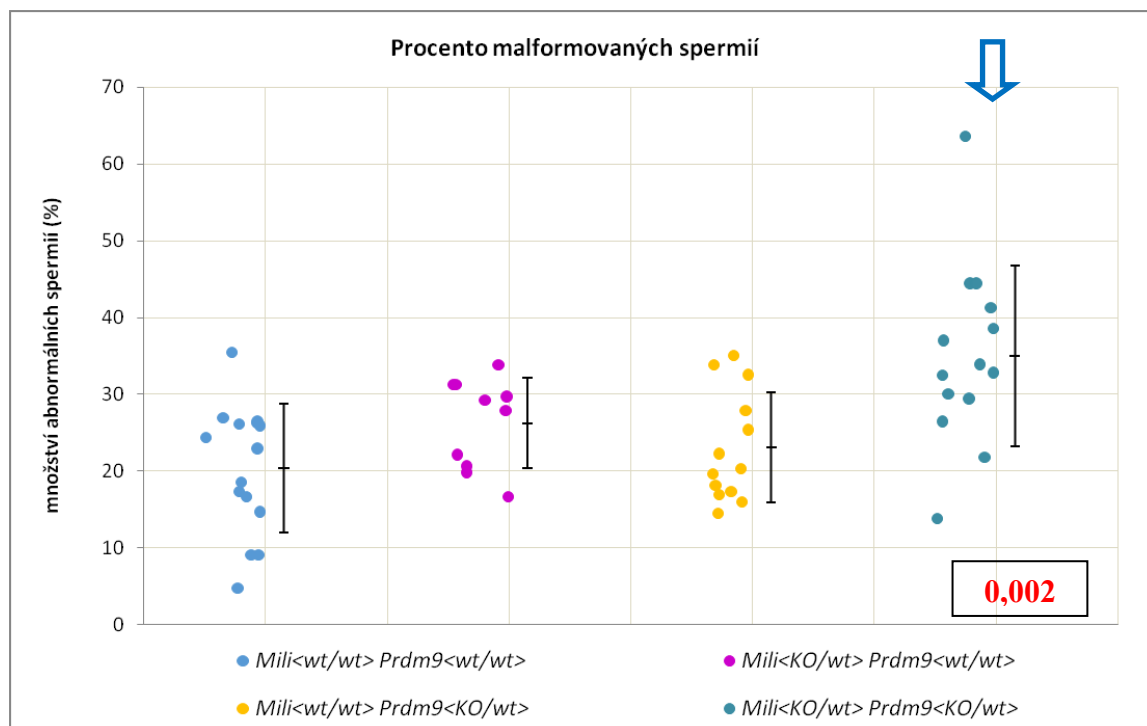
Graf. 5.10. Počet spermií v nadvarlatech u myši nesoucích spermie



Graf 5.11. Relativní hmotnost varlat u samců nesoucích spermie



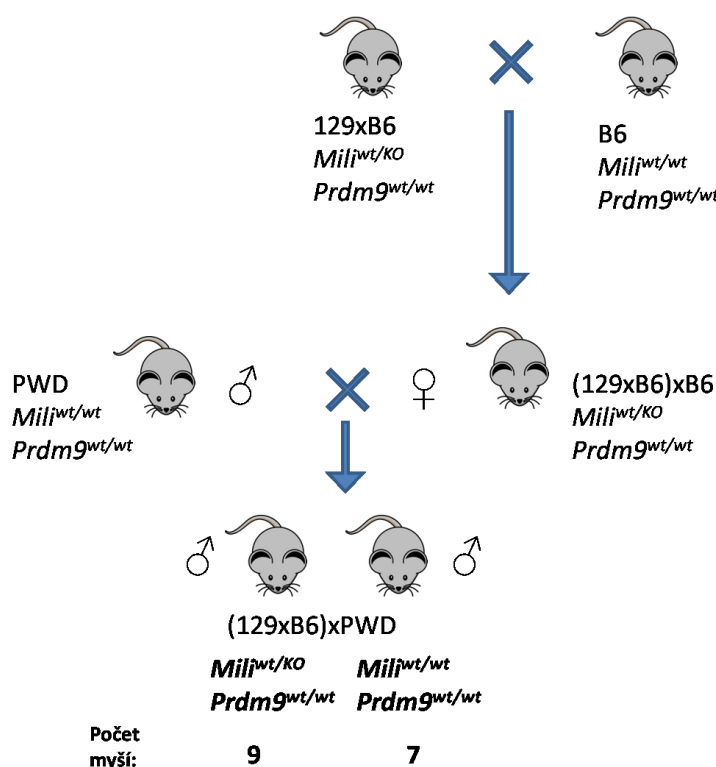
Graf. 5.12. Procento abnormálních spermií u samců nesoucích spermie



5.2.2 Mutace *Mili*^{DAH} neovlivňuje fertilitu u mezipoddruhových F1 hybridů

Myši heterozygotní pro mutaci *Mili*^{DAH} byly kříženy s myšmi s B6 pozadím. Takto vzniklé myši - samičky byly kříženy s PWD samci. Křížení probíhalo podle schématu (Obr. 5.5). U takto narozených samců s F1 pozadím byly stanoveny fertilitní parametry. Celkem bylo analyzováno 16 samců (Obr. 5.5), z toho 9 s mutací v *Mili*.

Obr. 5.5. Schéma křížení



Myši heterozygotní pro mutaci v *Mili* na F1 hybridním pozadí nevykazovaly oproti kontrolám změny ve hmotnosti těla ($p = 0,354$), relativní hmotnosti varlat ($p = 0,901$), počtu spermií ($p = 0,335$) ani procentu abnormálních spermií v nadvarlatech ($p = 0,795$).

6 Diskuze

Zjišťovali jsme genetické interakce genu *Prdm9* se dvěma geny podstatnými pro spermatogenezi – *Mybl1* a *Mili* (*Piwil2*).

Křížením myši nesoucích mutantní alely těchto genů – nulové alely *Prdm9^{tm1Ymat}*, mutantní alely *Mili^{DAH}* (*Piwil2^{tm1.1Doca}*) a mutantní alely *Mybl1^{repro9}* – jsme vytvořili myši nesoucí dvě mutantní alely – pro *Prdm9* a *Mybl1* nebo *Mili* – v heterozygotním a (pro *Mybl1*) homozygotním stavu. Fenotyp těchto myši jsme určovali pomocí stanovení parametrů myších samců – hmotnosti těla, relativní hmotnosti varlat, počtu spermií v obou nadvarlatech a procentuální podíl spermií s abnormální morfologií. U křížení týkajících se interakce genů *Prdm9* a *Mybl1* jsme stanovovali i poměrné zastoupení tubulů obsahujících spermatocyty a procento pachytenních spermatocytů s defekty v synapsi. Analýzu jsme prováděli v laboratorní myši (*M. m. domesticus*). Protože je znám vliv piRNA dráhy na hybridní dysgenezi (Brennecke et al., 2008) a *Prdm9* na hybridní sterilitu (Mihola et al., 2009), použili jsme také mezipoddrhové F1 hybridy.

Prdm9

Samci deficientní pro *Prdm9* byli sterilní – neměli spermie v nadvarlatech a histologie varlat odhalila zástavu meiózy ve stádiu spermatocytů, což je v souladu s daty v publikacích (Hayashi et al., 2005; Mihola et al., 2009; Flachs et al., 2012; Sun et al., 2015).

Samci heterozygotní pro nulovou alelu *Prdm9* byli fertilní. Detekovali jsme u nich i zvýšené množství (12%) aberantních jader pachytenních spermatocytů oproti našim kontrolám (ti měli 6% spermatocytů s asynapsemi). Baker et al. (2015) také detekovali zvýšené množství (5%) abnormálních jader u heterozygotů, ale ne zvýšené jako u našich dat, jejich kontroly měly pouze 1% jader s defekty v synapsi. Rozdíly mohly vzniknout kvůli malému počtu myši u obou studií - oproti nám v Baker et al. (2015) analyzovali pomocí imunocytochemie 7 samců (4 heterozygoty a 3 kontroly), my jsme zkoumali fenotyp u 5 samců (4 heterozygoty a pouze 1 kontrolu). Naše barvení také zahrnovalo jinou kombinaci protilátek: SYCP3, HORMAD2 a γ H2AFX; u Baker et al. (2015) to byly protilátky SYCP1, SYCP3 a γ H2AFX. V našem případě proto mohlo dojít i k upřesnění výsledků, protože asynapse jsou značeny zároveň protilátkou proti HORMAD2 a γ H2AFX. Dalším problémem u vyhodnocování imunocytochemie je rozpoznávání stádií profáze I, zejména přechod zygotene-pachytene, který nelze v případě velkého množství

asynapsí v jádře jednoduše odlišit. Nicméně naše studie potvrzuje částečnou haploinsuficienci *Prdm9* pro meiotickou profázi I na vnitrodruhovém pozadí.

Prdm9 a Mybl1

Samci nesoucí mutantní alelu *Mybl1^{repro9}* v homozygotním stavu neměli přítomné spermie v nadvarlatech. V semenotvorných kanálcích nebyly pozorovány pozdější stádia než spermatocyty a samci byli dle očekávání sterilní (Bolcun-Filas et al., 2011). Nepřímé imunofluorescenční barvení jader pachytenních spermatocytů ukázalo zvýšené procento chromozomů s defektní synapsí (38%). Bolcun-Filas et al. (2011) stanovili u homozygotů pro mutaci *Mybl1^{repro9}* procento jader pachytenních spermatocytů s defekty v synapsi na 51,2%. Výsledky z imunocytochemie se mohly opět lišit (kromě výše uvedených důvodů) kvůli malému počtu analyzovaných myši (v této práci 1 samec) a nebo opět díky odlišné kombinaci primárních protilátek (Bolcun-Filas et al. (2011) - SYCP1, SYCP3 a γ H2AFX). Další možností je vliv genetického pozadí – my jsme myši křížili na B6 pozadí, u Bolcun-Filas et al. (2011) byly myši převážně na genetickém pozadí C3H.

Samci dvojité homozygotní pro mutace v *Mybl1* a *Prdm9* byli sterilní, stejně jako myši deficientní pouze pro jeden z těchto genů. V nadvarlatech nebyly detekovány spermie a tito samci se v hmotnosti těla, relativní hmotnosti varlat ani v podílu tubulů obsahujících spermatocyty nelišili od kontrol (myši homozygotní pro mutaci pouze v jednom genu).

Fenotyp deficiencie *Prdm9* a *Mybl1* se liší daty imunocytochemické analýzy, kdy myši deficientní pro *Prdm9* měly téměř 100% jader pachytenních spermatocytů v asynapsi, ale myši nesoucí mutantní alelu *Mybl1* měly množství defektních jader nižší. U dvojitých homozygotů byla téměř všechna jádra asynaptická, což odpovídá fenotypu deficiencie *Prdm9*, který v tomto případě zřejmě převládá. K situaci, kdy převládne výraznější meiotická zástava nad mírnější, nemusí ovšem nutně dojít vždy (Reinholdt & Schimenti, 2005; Shin et al., 2013). Vzhledem k tomu, že fenotyp dvojitých homozygotů odpovídá spíše deficienci *Prdm9*, je možné, že *Prdm9* hraje roli v regulační dráze „upstream“ od (dříve než) *Mybl1*.

Dvojití heterozygoti nesoucí mutace *Prdm9^{tm1Ymat}* a *Mybl1^{repro9}* měli ve srovnání s kontrolami o 16% snížené množství spermií v nadvarlatech a o 33% zvýšené procento abnormálních spermií. Také byla o 10% redukována relativní hmotnost varlat. Histologická analýza potvrdila neporušený průběh meiózy a imunocytochemie procento spermatocytů s asynapsí podobné jako u kontrol (jednoduchých heterozygotů a myši

bez mutace). Snížená dávka obou genů – *Prdm9* a *Mybl1* tedy způsobuje zhoršení fertilitních parametrů oproti jednoduchým heterozygotům, což by mohlo naznačovat, že by se tyto dva geny mohly účastnit stejné regulační dráhy, či spolu jinak interagovat.

Myši heterozygotní pro mutaci *Mybl1* na F1 pozadí mezipoddruhových hybridů měly asi 25-krát redukovaný počet spermií v nadvarlatech a o 17% zvýšený podíl spermií s malformacemi a o 16% redukovanou relativní hmotnost varlat. Snížená dávka genu *Mybl1* tedy na tomto pozadí ovlivněném *Prdm9* značně snižuje fertilitu hybridů. Snížená dávka *Prdm9* oproti tomu fertilitu hybridů zvyšuje (Flachs et al., 2012).

Výsledky tedy naznačují, že by mohla existovat souvislost mezi geny *Prdm9* a *Mybl1*. Tato interakce by mohla být realizována například tím, že by *Mybl1* mohl přímo (nebo nepřímo) regulovat expresi nějakého faktoru interagujícího s PRDM9 a regulovat jeho asociaci nebo disociaci s chromatinem, případně s ním tvořit komplex.

Interakce *Mybl1* s *Prdm9* by mohla dále ještě potvrdit analýza dalších myší, nejlépe nakřížených na inbrední B6 pozadí (N10), aby se minimalizovaly vlivy smíšeného genetického pozadí. Na druhé straně jsme podpořili naše závěry i zkoumáním samců na mezipoddruhovém pozadí. Závěry by se mohly potvrdit při budoucí aplikaci dalších metod, např. otestováním motility spermií, účinnosti *in vitro* fertilizace malformovanými spermii a a nebo stanovením počtu potomků.

Mili (Piwil2)

U myší nesoucích mutaci v genu *Mili*^{DAH} na F1 hybridním pozadí nebyla detekována změna fertilitních parametrů.

Samci dvojité heterozygotní pro *Mili*^{DAH} a *Prdm9*^{tm1Ymat} na pozadí laboratorní myši měli o 53% zvýšený podíl malformovaných spermií ve srovnání s kontrolami. Počty spermií a relativní hmotnosti varlat měli podobné jako kontroly.

Nebyla tedy nalezena podobná souvislost jako v případě interakce *Prdm9* s *Mybl1*. Zvýšený podíl malformovaných spermií u myší nesoucích mutaci *Mili*^{DAH} by mohl souviset s rolí piRNA dráhy ve spermiogenezi (Gou et al., 2014). Tento rozdíl se ale neprojevil u jednoduchých heterozygotů a PRDM9 v postmeiotické fázi spermatogeneze už exprimován není. PIWI proteiny také mají mít vliv na stav chromatinu (Grewal & Elgin, 2007), což by mohlo ovlivňovat preferenci vazby PRDM9.

Obecné vlivy na stanovení parametrů fertility

Výsledky mohly být ovlivněny kromě výše zmíněných faktorů ještě následujícími faktory: Myši byly před usmrcením cervikální dislokací uspány chloroformem. Ten může mít vliv na fyziologické procesy v myši. Myši byli ovšem účinkům chloroformu vystaveny po poměrně krátkou dobu (řádově minuty) a naše data nezahrnovala měření fyziologických procesů ani metabolických produktů. Spermie uchovávané v roztoku PBS byly pohyblivé ještě několik dní po pitvě, vliv na jejich motilitu a úmrtnost chloroform zřejmě nemá. Počet spermií byl stanovován Bürkerovou komůrkou. Tato metoda má jistý detekční limit – pokud myš má méně než 1 000 spermií v obou nadvarlatech, je nízká pravděpodobnost, že bude přítomnost spermií takto detekována. Vzhledem k tomu, že se komůrka používá opakovaně, je zde možné riziko kontaminace. K ověření výsledků pak napomáhá imunocytochemická a histologická analýza. K úskalím histologie patří například to, že se většinou neřeže a neodečítá celá tkáň varlete, ale pouze její část. V této práci byla místo hmotnosti varlat použita relativní hmotnost varlat. Jedná se o vztažení miligramu hmotnosti varlat na gram hmotnosti varlat a jedná se o přesnější ukazatel fertility, protože zohledňuje růst jedinců. Data získaná z této práce jsou platná pouze pro konkrétní generace křížení (N2-N8 pro křížení s *Mybl1* a N2-N5 pro křížení s *Mili*) a pro myši s konkrétním podílem sekvence B6 na svém genetickém pozadí.

7 Souhrn

V této práci byly zjišťovány genetické interakce genu *Prdm9* se dvěma dalšími geny – *Mybl1* a *Mili* (*Piwil2*) - pomocí zjišťování fertilitních parametrů u myši nesoucích mutace pro tyto geny (*Prdm9*^{tm1Ymat}, *Mili*^{DAH} (*Piwil2*^{tm1.1Doca}), *Mybl1*^{repro9}).

Analýza myši dvojité heterozygotní pro mutace v genech *Mybl1* a *Prdm9* naznačila, že by mohla existovat interakce mezi geny *Mybl1* a *Prdm9* na pozadí laboratorní myši (platí pro generace N2-N8 křížení na B6). Snížená dávka *Mybl1* také pravděpodobně snižovala fertilitu mezipoddruhových F1 hybridů. Přinejmenším na dvou genetických pozadích je proto *Mybl1* parciálně haploinsuficientní.

Interakci genu *Mili* s *Prdm9* se nám nepodařilo detekovat (u N2-N5 generací křížení na B6 pozadí); *Mili* neovlivňoval ani fertilitu námi testovaných mezipoddruhových hybridů.

8 Seznam použité literatury

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2012). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13.
<https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Anderson, L. K., Reeves, A., Webb, L. M., & Ashley, T. (1999). Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics*, 151, 1569–1579.
- Aravin, A. A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., ... Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442, 203–207. <https://doi.org/10.1038/nature04916>
- Aravin, A. A., Hannon, G., & Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race. *Science*, 318, 761–764.
- Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Bourc 'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K. F., ... Hannon, G. J. (2008). A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Molecular Cell*, 31, 785–799.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.003>
- Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K., & Hannon, G. J. (2007). Developmentally Regulated piRNA Clusters Implicate MILI in Transposon Control. *Science*, 316. <https://doi.org/10.1126/science.1140597>
- Auton, A., Li, Y. R., Kidd, J., Oliveira, K., Nadel, J., Holloway, J. K., ... Henderson, I. (2013). Genetic Recombination Is Targeted towards Gene Promoter Regions in Dogs. *PLoS Genet*, 9(12), e1003984. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003984>
- Baker, C. L., Petkova, P., Walker, M., Flachs, P., Mihola, O., Trachtulec, Z., ... Paigen, K. (2015). Multimer Formation Explains Allelic Suppression of PRDM9 Recombination Hotspots. *PLoS Genetics*, 11, e1005512.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005512>
- Baker, Z., Schumer, M., Haba, Y., Bashkirova, L., Holland, C., Rosenthal, G. G., & Przeworski, M. (2017). Repeated losses of PRDM9-directed recombination despite the conservation of PRDM9 across vertebrates. *eLife*, 6, e24133.
<https://doi.org/10.7554/eLife.24133>
- Barlow, A., Benson, F., C. West, S., & A. Hultén, M. (1997). Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *The EMBO Journal*, 16, 5207–5215.
- Bass, H. W., Riera-Lizarazu, O., Ananiev, E. V., Bordoli, S. J., & et. al. (2000). Evidence

- for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *Journal of Cell Science*, 113, 1033–1042.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., ... De Massy, B. (2010). PRDM9 is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in humans and mice. *Science*, 327, 836–840. <https://doi.org/10.1126/science.1183439>
- *Baudat, F., Imai, Y., & de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Publishing Group*, 14, 794–806. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>
- Beyret, E., Liu, N., & Lin, H. (2012). piRNA biogenesis during adult spermatogenesis in mice is independent of the ping-pong mechanism. *Cell Research*, 22(22). <https://doi.org/10.1038/cr.2012.120>
- Bhattacharyya, T., Reifova, R., Gregorova, S., Simecek, P., Gergelits, V., Mistrik, M., ... Forejt, J. (2014). X Chromosome Control of Meiotic Chromosome Synapsis in Mouse Inter-Subspecific Hybrids. *PLoS Genetics*, 10, e1004088. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004088>
- Bolcun-Filas, E., Bannister, L. A., Barash, A., Schimenti, K. J., Hartford, S. A., Eppig, J. J., ... Schimenti, J. C. (2011). A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. *Development*, 138, 3319–3330. <https://doi.org/10.1242/dev.067645>
- *Bolcun-Filas, E., & Schimenti, J. C. (2012). *Genetics of Meiosis and Recombination in Mice. International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 298). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00005-5>
- Bourc'his, D., & Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431, 96–99. <https://doi.org/doi:10.1038/nature02886>
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila. *Cell*, 128, 1089–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
- Brennecke, J., Malone, C. D., Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Stark, A., & Hannon, G. J. (2008). An Epigenetic Role for Maternally Inherited piRNAs in Transposon Silencing. *Science*, 322, 1387–1392. <https://doi.org/10.1126/science.1164216>
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R. D., & Petukhova, G. V. (2012).

- Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature*, 485, 642–645. <https://doi.org/10.1038/nature11089>
- Campanini, E. B., Vandewege, M. W., Pillai, N. E., Tay, B. H., Jones, J. L., Venkatesh, B., & Hoffmann, F. G. (2015). Early evolution of vertebrate mybs: An integrative perspective combining synteny, phylogenetic, and gene expression analyses. *Genome Biology and Evolution*, 7, 3009–3021. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv197>
- Carmell, M. A., Girard, A., van de Kant, H. J. G., Bourc’his, D., Bestor, T. H., de Rooij, D. G., & Hannon, G. J. (2007). MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell*, 12(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.001>
- Davies, B., Hatton, E., Altemose, N., Hussin, J. G., Pratto, F., Zhang, G., ... Donnelly, P. (2016). Re-engineering the zinc fingers of PRDM9 reverses hybrid sterility in mice. *Nature*, 530(1), 171–176. <https://doi.org/10.1038/nature16931>
- De Fazio, S., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Abreu-Goodger, C., Sankar, A., Funaya, C., ... O ’carroll, D. (2011). The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*, 480, 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature10547>
- Deng, W., & Lin, H. (2002). miwi, a Murine Homolog of piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Developmental Cell*, 2, 819–830.
- Flachs, P., Bhattacharyya, T., Mihola, O., Piálek, J., Forejt, J., & Trachtulec, Z. (2014). Prdm9 incompatibility controls oligospermia and delayed fertility but no selfish transmission in mouse intersubspecific hybrids. *PLoS ONE*, 9(4), e95806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095806>
- Flachs, P., Mihola, O., Šimeček, P., Gregorová, S., Schimenti, J. C., Matsui, Y., ... Trachtulec, Z. (2012). Interallelic and Intergenic Incompatibilities of the Prdm9 (Hst1) Gene in Mouse Hybrid Sterility. *PLoS Genetics*, 8, e1003044. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003044>
- Flemr, M., Malik, R., Franke, V., Nejepinska, J., Sedlacek, R., Vlahovicek, K., & Svoboda, P. (2013). A Retrotransposon-Driven Dicer Isoform Directs Endogenous Small Interfering RNA Production in Mouse Oocytes. *Cell*, 155, 807–816. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.001>
- *Fu, Q., & Wang, P. J. (2014). Mammalian piRNAs: Biogenesis, function, and mysteries. *Spermatogenesis*, 4, e27889.
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental biology* (Eleventh E). Sinauer

- Associates, Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_8
- Gou, L.-T., Dai, P., Yang, J.-H., Xue, Y., Hu, Y.-P., Zhou, Y., ... Liu, M.-F. (2014). Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Research*, 2441(2410), 680–700. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.41>
- *Gray, S., & Cohen, P. E. (2016). Control of Meiotic Crossovers: From Double-Strand Break Formation to Designation. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 175–210. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035111>
- Gregorová, S., Divina, P., Storchová, R., Trachtulec, Z., Fotopulosova, V., Svenson, K. L., ... Forejt, J. (2008). Mouse consomic strains: Exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Research*, 18, 509–515. <https://doi.org/10.1101/gr.7160508>
- Gregorová, S., & Forejt, J. (2000). PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies - A valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biologica*, 46, 31–42.
- Grewal, S. I., & Elgin, S. C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, 447, 399–406.
- Grey, C., Clément, J. A. J., Buard, J., Leblanc, B., Gut, I., Gut, M., ... De Massy, B. (2017). In vivo binding of PRDM9 reveals interactions with noncanonical genomic sites. *Genome Research*, 27, 580–590. <https://doi.org/10.1101/gr.217240.116>
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 9, 411–416.
- Hayashi, K., Yoshida, K., & Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature*, 438(17), 374–378. <https://doi.org/10.1038/nature04112>
- *Hess, R. A., & de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- Homolka, D., Ivanek, R., Capkova, J., Jansa, P., & Forejt, J. (2007). Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Research*, 17(10), 1431–1437. <https://doi.org/10.1101/gr.6520107>
- *Huang, C. R. L., Burns, K. H., & Boeke, J. D. (2012). Active Transposition in Genomes. *Annual Review of Genetics*, 46, 651–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155616>
- Ishiguro, K., Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S., & Watanabe, Y. (2011). A new

- meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Reports*, 12(3), 267–275. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.2>
- *Kazazian, H. H. (2004). Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*, 303, 1626–1632.
- Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. (1997). Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. *Cell*, 88, 375–384. Retrieved from [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)81876-0.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)81876-0.pdf)
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., ... Nakano, T. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 131, 839–849. <https://doi.org/10.1242/dev.00973>
- Lamarche, B. J., Orazio, N. I., & Weitzman, M. D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters*, 584(17), 3682–3695. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.029>
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., & Reik, W. (2003). Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, 35(2), 88–93. <https://doi.org/10.1002/gene.10168>
- Li, X. Z., Roy, C. K., Dong, X., Bolcun-Filas, E., Wang, J., Han, B. W., ... Zamore, P. D. (2013). An Ancient Transcription Factor Initiates the Burst of piRNA Production during Early Meiosis in Mouse Testes. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.016>
- Lu, J., Gu, Y., Feng, J., Zhou, W., Yang, X., & Shen, Y. (2014). Structural Insight into the Central Element Assembly of the Synaptonemal Complex. *Scientific Reports*, 4, 7059. <https://doi.org/10.1038/srep07059>
- Manakov, S. A., Pezic, D., Marinov, G. K., Pastor, W. A., Sachidanandam, R., & Aravin, A. A. (2015). MIWI2 and MILI Have Differential Effects on piRNA Biogenesis and DNA Methylation. *Cell Reports*, 12, 1234–1243. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.036>
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J. C., & Forejt, J. (2009). A Mouse Speciation Gene Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase. *Science*, 323, 373–375.
- Muñoz-Fuentes, V., Rienzo, A. Di, & Vilà, C. (2011). Prdm9, a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots, Is Not Functional in Dogs and Their Wild

- Relatives, Wolves and Coyotes. *PLoS ONE*, 6, e25498.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025498>
- Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R. E., Freeman, C., Macfie, T. S., ...
 Donnelly, P. (2010). Drive Against Hotspot Motifs in Primates Implicates the
 PRDM9 gene in Meiotic Recombination: We provide evidence that a rapidly evolving
 gene is involved in determining recombination hotspot locations in humans. *Science*,
 327. <https://doi.org/10.1126/science.1182363>
- Narasimhan, V. M., Hunt, K. A., Mason, D., Baker, C. L., Karczewski, K. J., Barnes, M.
 R., ... Hee, D. A. van. (2016). Health and population effects of rare gene knockouts in
 adult humans with related parents. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aac8624>
- Oliver, P. L., Goodstadt, L., Bayes, J. J., Birtle, Z., Roach, K. C., Phadnis, N., ... Ponting,
 C. P. (2009). Accelerated Evolution of the Prdm9 Speciation Gene across Diverse
 Metazoan Taxa. *PLoS Genet*, 5(12), e1000753.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000753>
- *Paigen, K., & Petkov, P. (2010). Mammalian recombination hot spots: properties, control
 and evolution. *Nat. Rev. Genet.*, 11, 221–233. <https://doi.org/10.1038/nrg2712>
- Parvanov, E. D., Petkov, P. M., & Paigen, K. (2010). Prdm9 Controls Activation of
 Mammalian Recombination Hotspots. *Science*, 327, 835.
<https://doi.org/10.1126/science.1181495>
- Parvanov, E. D., Tiana, H., Billingsa, T., Saxla, R. L., Sprucea, C., Aithalb, R., ... Petkov,
 P. M. (2017). PRDM9 interactions with other proteins provide a link between
 recombination hotspots and the chromosomal axis in meiosis. *Molecular Biology of
 the Cell*, 28, 488–499. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-09-0686>
- Perry, J., Palmer, S., Gabriel, A., & Ashworth, A. (2001). A Short Pseudoautosomal
 Region in Laboratory Mice. *Genome Research*, 11, 1826–1832.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., & Nasmyth, K. (2003). Un Ménage à Quatre: The
 Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell*, 112(4), 423–440.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00083-7)
- *Phillips, P. C. (2008). Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure
 and evolution of genetic systems. *Nat. Rev. Genet.*, 9, 855–867.
<https://doi.org/10.1038/nrg2452>
- Powers, N. R., Parvanov, E. D., Baker, C. L., Walker, M., Petkov, P. M., & Paigen, K.
 (2016). The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36
 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo. *PLoS Genetics*, 12, e1006146.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006146>

- Reinholdt, L. G., & Schimenti, J. C. (2005). Mei1 is epistatic to Dmc1 during mouse meiosis. *Chromosoma*, 114(2), 127–134. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0346-4>
- Reuter, M., Berninger, P., Chuma, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C., ... Pillai, R. S. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA amplification- independent LINE1 transposon silencing. *Nature*, 480, 266–269. <https://doi.org/10.1038/nature10672>
- Shin, Y.-H., McGuire, M. M., & Rajkovic, A. (2013). Mouse HORMAD1 Is a Meiosis I Checkpoint Protein That Modulates DNA Double-Strand Break Repair During Female Meiosis1. *Biology of Reproduction*, 89(2), 29. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106773>
- *Silver, L. M. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. Oxford University Press. <http://www.informatics.jax.org/silver/>
- Smagulova, F., Brick, K., Pu, Y., Camerini-Otero, R. D., & Petukhova, G. V. (2016). The evolutionary turnover of recombination hot spots contributes to speciation in mice. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.270009.115>
- Snyder, E., Soundararajan, R., Sharma, M., Dearth, A., Smith, B., & Braun, R. E. (2015). Compound Heterozygosity for Y Box Proteins Causes Sterility Due to Loss of Translational Repression. *PLoS Genetics*, 11, e1005690. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005690>
- Sun, F., Fujiwara, Y., Reinholdt, L. G., Hu, J., Saxl, R. L., Baker, C. L., ... Handel, M. A. (2015). Nuclear localization of PRDM9 and its role in meiotic chromatin modifications and homologous synapsis. *Chromosoma*, 124, 397–415. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0511-3>
- Toscani, A., Mettus, R., Coupland, R., Simpkins, H., Litvin, J., Orth, J., ... Reddy, E. (1997). Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature*, 386(6626), 713–7.
- Trauth, K., Mutschler, B., Jenkins1, N. A., Gilbert1, D. J., Copeland1, N. G., & Klempnauer2, K.-H. (1994). Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *The EMBO Journal*, 13(24), 5994–6005. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395575/pdf/emboj00072-0210.pdf>
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, A. A., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR- Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 29, 52–54.

- *Turner James M. A. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, 134(10), 1823–1831. <https://doi.org/10.1242/dev.000018>
- Ward, A., Hopkins, J., McKay, M., Murray, S., & Jordan, P. W. (2016). Genetic Interactions Between the Meiosis-Specific Cohesin Components, STAG3, REC8, and RAD21L. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(6), 1713–24. <https://doi.org/10.1534/g3.116.029462>
- Weiss, J., Hurley, L. A., Harris, R. M., Finlayson, C., Tong, M., Fisher, L. A., ... Jameson, J. L. (2012). ENU mutagenesis in mice identifies candidate genes for hypogonadism. *Mammalian Genome*, 23, 346–355. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9388-5>
- Wilkins, A. S., & Holliday, R. (2009). The Evolution of Meiosis From Mitosis. *Genetics*, 181, 399–406. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.099762>
- Wilson, L., Ching, Y., Farias, M., Wilson, L., Ching, Y., Farias, M., ... Schimenti, J. C. (2005). Random mutagenesis of proximal mouse chromosome 5 uncovers predominantly embryonic lethal mutations Random mutagenesis of proximal mouse chromosome 5 uncovers predominantly embryonic lethal mutations. *Genome Research*, 15, 1095–1105. <https://doi.org/10.1101/gr.3826505>
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., ... Toth, A. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, Two Conserved Meiotic Chromosomal Proteins, Are Depleted from Synapsed Chromosome Axes with the Help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000702>
- Yang, H., Bell, T. A., Churchill, G. A., & Pardo-Manuel de Villena, F. (2007). On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nature Genetics*, 39, 1100–1107. <https://doi.org/10.1038/ng2087>

*sekundární citace

